

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE VALENGA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE
NANOFILMES A PARTIR DE GALACTOMANANA E ALGINATO**

**CURITIBA
2011**

FRANCINE VALENGA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE
NANOFILMES A PARTIR DE GALACTOMANANA E ALGINATO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Rita Sierakowski
Co-orientador: Prof. Dr. Gero Decher

**CURITIBA
2011**

**Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas**

Valenga, Francine

Desenvolvimento, caracterização e funcionalização de nanofilmes a partir da galactomanana e alginato. / Francine Valenga. – Curitiba, 2012. 155 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Rita Maria Sierakowski

Co-orientador: Gero Decher

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Galactomanana 2. Alginato 3. Nanofilmes I. Título II. Sierakowski, Rita Maria III. Decher, Gero IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

CDD (20. ed.)

TERMO DE APROVAÇÃO

FRANCINE VALENGA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO
DE NANOFILMES A PARTIR DE GALACTOMANANA E ALGINATO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora.

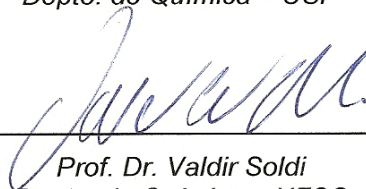
Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Maria Rita Sierakowski (orientadora)
Depto. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Denise F. S. Petri
Depto. de Química – USP



Prof. Dr. Valdir Soldi
Depto. de Química – UFSC



Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Depto. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Elaine Machado Benelli
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 22 de novembro de 2011.

À minha família,
meu pai Jorge, minha mãe Rosane e
aos meus irmãos, Francielle e Jorginho,
pessoas fundamentais em minha vida.

Ao meu marido Henrique, que esteve
sempre ao meu lado. Sempre mesmo.

*“ Tu deviens responsable pour
toujours de ce que tu as apprivoisé.”*

Antoine de Saint-Exupéry
Le Petit Prince

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, guiando e iluminando minha vida com tantas bênçãos.

À minha querida família, meus pais, Jorge Valenga e Rosane Valenga, minha amiga-irmã Francielle e meu irmão Jorginho, por serem sempre meu apoio de vida.

Ao meu marido Henrique Aguiar, meu maior incentivador que me acompanha em todos momentos na minha vida, ajudando, apoiando e me completando. Obrigado por ser sempre meu tudo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Rita Sierakowski, que me acolheu desde a Iniciação Científica e contribuiu muito com minha formação. Com paciência, respeito e admiração tivemos mais do que apenas uma vida científica, mas uma vida de amizade.

Ao Prof. Dr. Gero Decher, um dos maiores seres humanos que conheci. Agradeço por ter me convidado a participar da sua equipe e me dar uma das maiores oportunidades científicas e culturais.

À Prof. Dra. Denise F.S. Petri pela orientação de parte desse trabalho, pelo aprendizado e pelos bons momentos na USP/SP.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas pelos pelas análises de citotoxicidade, GPC, fluorescência, correções, além das longas conversas científicas ou não.

Ao Prof. Dr. Miguel Nosedá não apenas por aceitar ser minha banca interna, mas por todo apoio que me deu durante todo o doutorado.

Às Prof. Dra. Fany Reicher e Prof. Dra. Elaine Benelli por aceitarem ser minha banca interna e contribuir para meu trabalho.

Ao Prof. Wido Herwig Schreiner, do Departamento de Física da UFPR, por sido muito solícito e ter me ajudado nas pelas análises de XPS.

À Prof.^a Leila M. Beltramini, do Instituto de Física da USP, São Carlos, por sua colaboração e orientação nos experimentos de dicroísmo.

Ao Prof. Dr. Benedito A. L. Fonseca, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, por fornecer os vírus da dengue.

À Dra. Neoli Lucyszyn, que contribuiu muito para essa tese, em correções, idéias e trabalho. Obrigada pela amizade, pela companhia, pelas conversas, pelos cafezinhos, por tudo que passamos juntas.

Às Prof. Dra. Lucy Ono e Prof. Dra. Sandra Martin, sempre Biopol, por ter me direcionado, orientado e apoiado desde a minha iniciação.

À Tatiane Akemi Jó Ducatti, uma grande amiga e excelente parceira de equipe, que me ajudou não apenas cientificamente mas também pessoalmente. Agradeço também a sua família, S. Francisco, D. Marina, Mayra e Juli pela ótima hospitalidade japonesa.

Ao Clayton Fernandes de Souza por ser um grande amigo no Biopol e por ter ajudado, mesmo quando eu estava longe. À eterna colega de Biopol, Cristiane Ribeiro pela amizade e pelo apoio. À Paulinha e ao César Tischer pela amizade e conversas no Brasil e na França. À Adriana Lubambo por tornar o Biopol divertido. Ao Fernando Ferraz, pelas conversas, pelo café e pelas análises do GPC.

Aos colegas e família Biopol que sempre ajudam em diferentes momentos.

À querida amiga Caroline Valente que sempre me ajudou muito na minha vida, além de ser a ponte entre informações Biológicas-Química-França.

À grande amiga Maria Alice Witt, por ter me ajudado muito na França, trabalhando, rindo, viajando. Foi muito bom estarmos juntas nesse tempo.

À Patricia Santos, que contribuiu muito nas análises com as células, não só montando o laboratório, como ensinando a manipular.

Ao Dr. Olivier Felix por ter me ajudado com a burocracia e com a vida na França. E também, por tudo o que fez no laboratório por mim.

Aos colegas do ICS: Rebecca Blell, Dominique Sauter, Rita El-Khoury, Rafael Szamocki, Jean-Louis Tecquert, Emek Seyrek, Nejla Cini, Gabriela Popa que me ajudaram em discussões, correções e pesquisa.

À Coordenação e ao Colegiado do curso de Pós-graduação e à secretária D. Marilza Doroti Lamour.

À CAPES, pela minha bolsa no Brasil e pela bolsa sanduíche, CNPq, Rede Nanobiotec, Ministério da Ciência e Tecnologia e CBAN pelo apoio financeiro.

RESUMO

As galactomananas (GM) podem modificar a viscosidade dos meios aquosos e o alginato (AL) em presença de íons Ca^{2+} geleifica, apresenta várias aplicações, entre as quais, a formação de filmes finos. As propriedades físico químicas desses dois polissacarídeos em solução, incluindo a interação entre eles, foram estudadas, com o objetivo de desenvolver materiais nanoestruturados na forma de filmes finos e utilizá-los para futuras aplicações biológicas. A GM empregada foi extraída de sementes de *Leucaena leucocephala* (GML) e, após purificação, apresentou um rendimento de 19,3% (m/m). O AL foi adquirido comercialmente. Ambos foram caracterizados como sendo homogêneos e com conformação ao acaso ($0,5 < \alpha < 0,8$). Apresentaram razão molar Man/Gal 1,7 e M/G 1; e M_w de $7,1 \times 10^5$ e $2,9 \times 10^5$ g/mol, respectivamente, para a GML e o AL os quais, em análises de toxicidade, indicaram pouca alteração na viabilidade celular. O comportamento de soluções aquosas foi caracterizado por espectroscopia de fluorescência (sonda de pireno) e forneceu os valores de CAC, 1,0 mg/mL para a GML e 0,57 mg/mL para o AL. Análises por dicroísmo circular confirmaram a interação da mistura GML-AL com albumina (ALB), através da alteração nos espectros do arranjo das cadeias dos polímeros. A mistura GML-AL (15 mg/mL, 50%, m/m) em análises reológicas mostrou a formação de um gel viscoelástico em presença de íons Ca^{2+} quando em pH 7,2 e em 11,2. As análises por microscopia de fluorescência dos derivados dos dois polissacarídeos comprovaram que a mistura GML-AL foi adsorvida sobre a lâmina de vidro e não foi removida durante as lavagens. A formação de filmes finos em monocamadas com a adsorção de GML sobre substratos de Si-aminofuncionalizados foi avaliada por isotermas e elipsometria, onde se determinou a concentração (1mg/mL) o pH (4,0) e a espessura (D, 1,5 nm). Sobre os filmes de GML foram adsorvidas proteínas como a ALB (D, 6,2 nm em pH 5,5) e a Concanavalina A (D, 1,6 nm em pH 4,5) e, também, diferentes sorotipos do vírus da dengue, sendo que o tipo 2 foi o que formou filmes mais espessos (D 3,7 nm em pH 7,2). A mistura GML-AL que tem características de um poliânion, comprovada pelo potencial zeta, foi aplicada em filmes multicamadas (LBL) obtidos através de diferentes técnicas de deposição e com diferentes polications poli(alilamina hidrocloreada) (PAH), poli-lisina (PLL) ou quitosana (CHI). Por análises de elipsometria e AFM os filmes contendo PAH foram os mais espessos e menos rugosos (rms 6 nm), e, por análises de QCM, os filmes com PLL foram os menos rígidos, e os com CHI foram o que tiveram maior mobilidade de água entre as camadas. Os filmes LBL foram avaliados em testes de adesão celular e todos permitiram o crescimento e o espalhamento das células (HeLa) em suas superfícies, mesmo após 8 dias de contato. Esses resultados sugerem uma potencial aplicação dos filmes monocamadas de GML para o desenvolvimento de biomateriais, incremento de biosensores e dispositivos biotecnológicos; e os filmes LBL do poliânion GML-AL como um potencial modelo para estudos de crescimento de células, e em aplicações terapêuticas para engenharia de tecidos.

Palavras chave: Galactomanana. Alginato. Nanofilmes. Albumina. Vírus da dengue. Adesão celular. Monocamada. *Layer-by-layer*.

ABSTRACT

Galactomannans (GM) can modify aqueous solution viscosities and sodium alginate (AL) gelatinized in presence of calcium ions, is also widely used in applications such as thin films formation. The physical-chemical properties of these polysaccharides in solutions, including their interaction, were evaluated aimed to develop nanostructured materials, such as thin films and use them into future biological applications. GM was extracted from the seeds of *Leucaena leucocephala* (GML) and showing a yield of 19.35% (w/w) after purification. AL was obtained from a commercial source. Both of them were characterized as homogeneous with random coil conformation ($0,5 < \alpha < 0,8$), Man/Gal 1,7 and M/G 1 molar ratio and \overline{M}_w of $7,1 \times 10^5$ and $2,9 \times 10^5$ g/mol, respectively, for GML and AL. The GML and AL cytotoxicity analysis showed almost no change in cell viability. The CAC values of 1,0 mg/mL for GML and 0,57 mg/mL for AL were obtained by fluorescence spectroscopies (pyrene probe). Circular dichroism confirmed the GML-AL mixture interaction with ALB through the spectra changes in the polymers chains conformations. The GML-AL mixture (15 mg/mL, 50%, w/w) with calcium ions at pH 7.2 and 11.2 showed a viscoelastic gel behaviour by rheological analysis. The fluorescence microscopy from the two derivate polysaccharides proved that the GML-AL mixture was adsorbed onto glass and was not removed during the wash steps. The GML isotherms adsorption onto amine-functionalized silicon formed a monolayer thin film, with the concentration of 1 mg/mL, pH of 4.0 and a 1.5 nm thickness set by ellipsometry. Proteins were adsorbed onto GML films, such as ALB (D: 6.2 nm, pH 5.5) and Concanavalin A (D: 1.6 nm, pH 4.5), and also different serotypes of dengue virus, being the virus type 2 the one that obtained the highest adsorption value (D: 3.7 nm, pH 7.2). The GML-AL mixture characterized as a polyanion by zeta potential measurements was applied in multilayers films (LBL). LBL films were obtained by different deposition techniques and using different polycations, poly(allylamine hydrochloride) (PAH), poly-L-lysine (PLL) or chitosan (CHI). By ellipsometry and AFM, films containing PAH were the thickest measured (RMS 6 nm), and from QCM-D analysis films with PLL were the less rigid and the CHI were the one that had the higher mobility of water between the layers. The LBL films were evaluated in cell adhesion experiments in which all of them allowed the cell growth and spreading (Hela cells) in their surface even after 8 days of contact. These results suggest a potential application of GML monolayers films for the development of biomaterials, for a rapid estimation of biosensors; and for biotechnological devices; and the application of LBL films using GML-AL as polyanion as a potential model for studies of cell growth, and therapeutic for tissue engineering.

Key words: Galactomannan. Alginate. Concanavalin A. Thin Film. Albumin Dengue Virus. Cell adhesion. Monolayer. *Layer by layer*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	IMAGEM DA LEGUMINOSA <i>Leucaena leucocephala</i>	2
FIGURA 2 -	ESTRUTURA PARCIAL DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA E DE GOMA -TARA	2
FIGURA 3 -	ESTRUTURA DO ALGINATO, A: UNIDADES DE ÁCIDO D-MANURÔNICO; B: UNIDADES DE ÁCIDO L-GULURÔNICO	5
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA TIPO CAIXA DE OVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SEQUÊNCIAS POLI – L – GULURONATO DO ALGINATO RETICULADA COM ÍONS CÁLCIO	6
FIGURA 5 -	CUBA DE LANGMUIR E SEUS ACESSÓRIOS UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DE FILMES DE LANGMUIR E LB	10
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE SAM, EM QUE O SUBSTRATO É COLOCADO EM UMA SOLUÇÃO CONTENDO MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS. APÓS CERTO TEMPO, MONOCAMADAS SÃO FORMADAS ESPONTÂNEA E ORDENADAMENTE	11
FIGURA 7 -	(A) ESQUEMA DO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO POR IMERSÃO DE DUAS SOLUÇÕES DIFERENTES. ETAPAS 1 E 3 DEMOSTRAM DEPOSIÇÃO DE POLIÂNION E DE POLICÁTION, RESPECTIVAMENTE; ETAPAS 2 E 4 REPRESENTAM LAVAGEM. ESSAS 4 ETAPAS SÃO OS PROCESSOS BÁSICOS DA DEPOSIÇÃO. (B) ILUSTRAÇÃO SIMPLIFICADA DE DUAS ETAPAS DE ADSORÇÃO, INICIANDO COM UM SUBSTRATO POSITIVO E UMA SOLUÇÃO NEGATIVA	13
FIGURA 8 -	PROCESSO DE DEPOSIÇÃO LBL ATRAVÉS DE <i>SPRAY</i> . 1 INDICA DEPOSIÇÃO DE POLIÂNION, 2 E 4 INDICAM A LAVAGEM E 3 DEPOSIÇÃO DE POLICÁTION	14
FIGURA 9 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARADO DE FILMES FINOS E HOMOGÊNEOS POR REVESTIMENTO ROTACIONAL (<i>SPIN COATING</i>) SOBRE LÂMINAS DE Si	15
FIGURA 10 -	ILUSTRAÇÃO DE UM MODELO DE ELIPSÔMETRO MOSTRANDO O ESTADO DA LUZ POLARIZADA SENDO REFLETIDA E PERCEBIDA PELO DETECTOR	21
FIGURA 11 -	ESTRUTURA BÁSICA DE UM MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA ..	22
FIGURA 12 -	MAPA DE FORÇAS ENTRE AMOSTRA E SONDA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA, CARACTERIZANDO OS DIFERENTES MODOS DE TRABALHO DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA	23
FIGURA 13 -	DESENHO ESQUEMÁTICO SOBRE A TÉCNICA DE QCM-D. AS ALTERAÇÕES COM O AUMENTO DA MASSA DEPOSITADA (C) ESTÃO REPRESENTADAS PARA FREQUÊNCIA (A), ONDE (---) É A MASSA INICIAL E (—) É A MASSA ACRESCIDA; E (B) DISSIPACÃO, ONDE (---) É UM COMPOSTO VISCOELÁSTICO E (—) UM COMPOSTO RÍGIDO.....	27
FIGURA 14 -	EXEMPLIFICAÇÃO DE ADSORÇÃO OBTIDA, ATRAVÉS DA TÉCNICA	

QCM-D, DE SORO ALBUMINA HUMANA (A) E SEU RESPECTIVO ANTICORPO (C). OS PASSOS (B) E (D) CORRESPONDEM AOS PROCESSOS DE LAVAGEM COM SOLUÇÃO TAMPÃO	28
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETECÇÃO POR DICROISMO CIRCULAR DA GLUCOSE, UM AÇÚCAR SIMPLES	30
FIGURA 16 - (A) ESPECTRO DE DICROÍSMO DE ESTRUTURAS α -HÉLICE (VERMELHO), FOLHA β (AZUL) E HÉLICE TIPO POLIPROLINA (AMARELO). (B) ESPECTRO DE DICROÍSMO DE CARRAGENANAS (3 g/L, EM KCl 0,01M, pH 7): λ - (LINHA PONTILHADA) QUE TEM CONFORMAÇÃO AO ACASO E ι - (LINHA CONTÍNUA) QUE TEM ESTRUTURA HELICOIDAL, À TEMPERATURA AMBIENTE	31
FIGURA 17 - ESPECTRO DE ^1H -RMN DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ALGINATO (AL), COM DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm .	51
FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML), POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (VERMELHO, RALS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL), EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL, a 25°C	53
FIGURA 19 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ALGINATO DE SÓDIO POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (VERDE, RALLS) E A 7° (PRETO, LALLS), E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (VERMELHO), EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL, a 25°C	55
FIGURA 20 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA QUITOSANA POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (VERDE, RALLS) E A 7° (PRETO, LALLS), E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (VERMELHO), EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL, a 25°C	56
FIGURA 21 - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM SOLUÇÃO AQUOSA	57
FIGURA 22 - GRÁFICO DA RELAÇÃO ENTRE OS PICOS III/I DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML), SOLUBILIZADA EM ÁGUA PURIFICADA	58
FIGURA 23 - GRÁFICO DA RELAÇÃO ENTRE OS PICOS III/I DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ALGINATO (AL), SOLUBILIZADO EM ÁGUA PURIFICADA	59
FIGURA 24 - GRÁFICO DE DICROÍSMO CIRCULAR DOS POLÍMEROS, A 1 mg/mL EM ÁGUA, (□) GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML); (□) ALGINATO (AL); (□) ALBUMINA (ALB); (□) MISTURA GML-AL SEM ALBUMINA (ALB) e (□) COM 1,0 mg/mL DE ALB, a 25°C	62
FIGURA 25 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) 1,0 mg/mL (A), DA MISTURA GALACTOMANANA-ALBUMINA (B) E DA SOLUÇÃO DE ALBUMINA (ALB) 1,0 mg/mL, POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (Δ , RALLS) E A 7° (O, LALLS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (\square) EM A E UV (\square) EM B E C, EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL	64
FIGURA 26 - CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS MISTURAS (15 mg/mL) DE	

GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)-ALGINATO (AL), EM SOLUÇÃO AQUOSA EM DIFERENTES pH, TAXA DE CISALHAMENTO DE 1 A 2. 10 ³ 1/s. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS 1, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C.....	66
FIGURA 27 - VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15 mg/mL) DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)-ALGINATO (AL), CONTENDO 45 mMOL/L DE ÍONS CÁLCIO, pH 4,2 (A), pH 7,2 (B) e pH 11,2 (C); EM FREQUÊNCIAS FIXAS DE 1 e 10 Hz. LEITURAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS 1, SENSOR PLACA DE 35	68
FIGURA 28 - CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg/mL) GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)-ALGINATO (AL) (A) pH 7,2 e (B) pH 11,2, CONTENDO 45 mMOL/L DE ÍONS CÁLCIO E TENSÃO FIXA DE 1Pa. (□) G', (●) G". AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS 1, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C	70
FIGURA 29 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS L929 EXPOSTAS POR 24h ÀS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) E ALGINATO (AL), EM CONCENTRAÇÕES DE 0,5 mg/mL (A) E 1,0 mg/mL (B), UTILIZANDO COMO CONTROLE NEGATIVO (CN) O TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS, pH 7,4) E O COMO CONTROLE POSITIVO (CP) O DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)	74
FIGURA 30 - VALORES MÉDIOS DE ESPESSURA (D) DE FILMES EM nm, DETERMINADOS POR ELIPSOMETRIA, OBTIDOS PARA A GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) SOLUBILIZADA EM NaCl, pH 4,0, DEPOSITADA EM PLACAS DE SILÍCIO AMINO FUNCIONALIZADAS	76
FIGURA 31 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DE FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO – APS (A), REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	77
FIGURA 32 - AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA O FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C _{1S} E N _{1S}	78
FIGURA 33 - ESPESSURAS DE FILMES DE ALBUMINA EM DIFERENTES pHs ADSORVIDOS SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML).....	80
FIGURA 34 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (1,4 X 1,4 µm) DA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA EM pH 5,5 SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	81
FIGURA 35 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. GML MARCADA COM RODAMINA (RO) E ALB COM FLUORESCÉINA (FL). (A) SOLUÇÃO GML-RO; (B) SOLUÇÃO ALB-FL; (C) FILME COM UMA MONOCAMADA DE GML-RO, E (D) FILME COM UMA MONOCAMADA DE GML SOBRE A QUAL FOI ADSORVIDA A ALB-FL	82
FIGURA 36 - AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA A PROTEÍNA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A	

DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C _{1s} E N _{1s}	83
FIGURA 37 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DA PROTEÍNA CONCANAVALINA (ConA) A IMOBILIZADA SOBRE FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO – APS (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	86
FIGURA 38 - AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA A PROTEÍNA CONCANAVALINA A (ConA) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C _{1s} E N _{1s}	88
FIGURA 39 - VALORES DE ESPESSURAS MÉDIA (D), EM nm, DETERMINADOS POR ELIPSOMETRIA PARA OS VÍRUS DA DENGUE (DENV-1, 2 E 3) ADSORVIDOS SOBRE OS FILMES DE GML	91
FIGURA 40 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DE VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	91
FIGURA 41 - AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA A ADSORÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C _{1s} E N _{1s}	93
FIGURA 42 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DE VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GML-ConA (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	95
FIGURA 43 - DESENHO ESQUEMÁTICO RESUMINDO A FORMAÇÃO DOS FILMES EM MONOCAMADA DE GML SOBRE APS-Si. EM (A), A DEPOSIÇÃO DE ALB SOBRE O FILME DE GML-APS, EM (B) A DEPOSIÇÃO DA ConA SOBRE O FILME DE GML-APS, EM (C) A DEPOSIÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE SOBRE O FILME DE GML-APS E EM (D) A DEPOSIÇÃO SIMULTÂNEA DO VÍRUS DA DENGUE E DA PROTEÍNA ConA SOBRE O FILME DE GML-APS	97
FIGURA 44 - DESENHO ESQUEMÁTICO RESUMINDO E DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DOS FILMES EM MONOCAMADA DE GML SOBRE APS-Si COM SUAS RESPECTIVAS ESPESSURAS	98
FIGURA 45 - IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA EM QUE SE MARCOU A GALACTOMANANA (GML) COM RODAMINA (RO) E O ALGINATO (AL) COM FLUORESCEÍNA (FL). (A) SOLUÇÃO DE GML-RO; (B) SOLUÇÃO DE AL-FL; (C) FILME COM 10 CAMADAS DA MISTURA GML-AL/PAH, CONTENDO A GML MARCADA COM RO E (D) FILME COM 10 CAMADAS DA MISTURA GML-AL/PAH, CONTENDO O AL MARCADO COM FL	100
FIGURA 46 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPESSURA DOS FILMES OBTIDOS PELA TÉCNICA LBL, COMPOSTOS PELA MISTURA GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH), APLICANDO OS MÉTODOS DE IMERSÃO (▲), DE SPRAY (□) E SPIN-COATING (●)	102

FIGURA 47 - EXEMPLO DE MUDANÇA DE COLORAÇÃO DO SUBSTRATO SILÍCIO CONFORME A DEPOSIÇÃO DE CAMADAS DO SISTEMA GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH)	103
FIGURA 48 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE <i>SPIN-COATING</i> (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	104
FIGURA 49 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE IMERSÃO (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	104
FIGURA 50 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE <i>SPRAY</i> (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	105
FIGURA 51 - DESLOCAMENTO DE FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA EM (A) E DISSIPAÇÃO EM (B) EM FUNÇÃO DAS CAMADAS DEPOSITADAS DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) ADSORVIDO SOBRE CRISTAL DE OURO, E MEDIDOS POR QCM-D. DADOS REFERENTES À FREQUÊNCIA DE 25 Hz	106
FIGURA 52 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPESSURA DOS FILMES OBTIDOS PELA TÉCNICA LBL, COMPOSTOS PELA MISTURA GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL), APLICANDO OS MÉTODOS DE IMERSÃO (\blacktriangle), DE <i>SPRAY</i> (\square) E <i>SPIN-COATING</i> (\bullet)	108
FIGURA 53 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE <i>SPIN-COATING</i> (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	111
FIGURA 54 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE IMERSÃO (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	111
FIGURA 55 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE <i>SPRAY</i> (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	112
FIGURA 56 - DESLOCAMENTO DE FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA EM (A) E DISSIPAÇÃO EM (B) EM FUNÇÃO DE CAMADAS DEPOSITADAS, DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA	

(GML-AL/PLL) LBL DE GML-AL/PLL ADSORVIDO SOBRE CRISTAL DE OURO, E MEDIDOS POR QCM-D DADOS REFERENTES À FREQUÊNCIA DE 25 Hz	113
FIGURA 57 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPESSURA DOS FILMES OBTIDOS PELA TÉCNICA LBL, COMPOSTOS POR PELA MISTURA GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI), APLICANDO OS MÉTODOS DE IMERSÃO (▲), DE <i>SPRAY</i> (□) E <i>SPIN-COATING</i> (●)	115
FIGURA 58 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE <i>SPIN-COATING</i> (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	116
FIGURA 59 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE IMERSÃO (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	116
FIGURA 60 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 µm) DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE <i>SPRAY</i> (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)	117
FIGURA 61 - DESLOCAMENTO DE FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA EM (A) E DISSIPAÇÃO EM (B) EM FUNÇÃO DAS CAMADAS DEPOSITADAS DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) FILME LBL DE GML-AL/CHI ADSORVIDO SOBRE CRISTAL DE OURO, E MEDIDOS POR QCM-D. DADOS REFERENTES À FREQUÊNCIA DE 25 Hz	118
FIGURA 62 - IMAGENS DE CÉLULAS HeLa CRESCIDAS NOS (A) FILMES MULTICAMADAS (10 MULTICAMADAS) DE (A) GML-AL/PAH, (B) GML-AL/PLL, (C) GML-AL/CHI, (D) GML-AL/PAH, APÓS 8 DIAS, (E) CONTROLE NEGATIVO	120
FIGURA 63 - ESQUEMA REPRESENTANDO OS FILMES MULTICAMADAS, FORMADOS PELAS DEPOSIÇÕES ALTERNADAS DE POLICÁTION E POLIÂNION, COM A ADSORÇÃO DE CÉLULAS SOBRE A SUPERFÍCIE DESSES FILMES	123

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	VALORES DE RENDIMENTO E DA RAZÃO MAN/GAL OBTIDOS PARA A GALACTOMANANA DE LEUCENA	49
TABELA 2 -	VALORES DE ANÁLISE ELEMENTAR (C, H e N) DA GALACTOMANANA PURIFICADA	50
TABELA 3 -	VALORES DE MASSA MOLAR, POLIDISPERSÃO, RAO DE GIRAÇÃO, RAO HIDRODINÂMICO, VISCOSIDADE INTRÍNSECA E CONSTANTE DE MARK-HOUWINK PARA A GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ⁽¹⁾ EM SOLUÇÃO DE NITRATO DE SÓDIO 0,5 mg/mL, PARA O ALGINATO DE SÓDIO 1 mg/mL ⁽¹⁾ E PARA QUITOSANA ⁽¹⁾	54
TABELA 4 -	RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE G''/G' ($\tan \delta$) PARA OS SISTEMAS DE GALACTOMANANA-ALGINATO- Ca^{2+} NOS DIFERENTES pHs, EM TENSÃO FIXA DE 3 Pa	69
TABELA 5 -	DADOS DE POTENCIAL ZETA MEDIDOS PARA SOLUÇÕES DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML), ALGINATO (AL), PARA A MISTURA GML-AL, PARA O POLÍMERO POLI(ETILENIMINA) (PEI), PARA A POLI(ALILAMINA HIDROCLORADA) (PAH), PARA QUITOSANA (CHI), PARA A POLI-L-LISINA (PLL) E PARA A ÁGUA	72
TABELA 6 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE O SILÍCIO – APS	79
TABELA 7 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE O SILÍCIO – APS	79
TABELA 8 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)	84
TABELA 9 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)	85
TABELA 10 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA CONCANAVALINA A (ConA) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)	89
TABELA 11 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA CONCANAVALINA A (ConA) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML).....	89
TABELA 12 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DO VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)	94

TABELA 13 -	DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DO VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)	94
TABELA 14 -	DADOS DE pK_a PARA OS POLÍMEROS ALGINATO, POLI(ALILAMINA HIDROCLORADA), POLI-L-LISINA (PLL) E QUITOSANA	99

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

^1H	-	Próton
A	-	Área geométrica piezoelectricamente ativa
ADE	-	Anticorpos de reforço dependentes de infecção
AFM	-	Microscopia de Força Atômica
AL	-	Alginato de sódio
AL-FL	-	Alginato – Fluoresceína
ALB	-	Albumina
ALB-FL	-	Albumina – Fluoresceína
BCRJ	-	Banco de células do Rio de Janeiro
APS	-	Aminopropiltrimetoxisilano
BSA	-	Albumina bovina
C_{1s}	-	Nível de energia 1s do átomo de carbono
CAC	-	Concentração crítica de agregação
CD	-	Dicroísmo circular
CG	-	Cromatografia gasosa
CHI	-	Quitosana
CHN	-	Carbono, hidrogênio e nitrogênio
CL_{50}	-	Concentração letal de 50%
CMC	-	Carboximetilcelulose
ConA	-	Concanavalina A
CN	-	Controle negativo
c_{poli}	-	Concentração média dentro da camada
CP	-	Controle positivo
D	-	Espessura
D_2O	-	Água deuterada
DENV	-	Vírus da dengue
DMEM	-	Meio essencial de Eagle modificado por Dubelcco
DMF	-	Dimetilformamida
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
dn/dc	-	Constante que relaciona o índice de refração em função da concentração

d_{poli}	-	Espessura do filme
EDC	-	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	-	Técnica imunoenzimática
ESCA	-	Espectroscopia eletrônica para análise química
f_0	-	Frequência fundamental
G	-	Ácido gulurônico
G'	-	Módulo elástico
G''	-	Módulo viscoso
Gal	-	Galactose
GM	-	Galactomanana
GML	-	Galactomanana de leucena purificada
GML-RO	-	Galactomanana – Rodamina
GPC	-	Cromatografia de gel permeação
HA	-	Ácido hialurônico
HeLa	-	Henrietta Lacks
HIV	-	Vírus da imunodeficiência
$^1\text{H-RMN}$	-	Ressonância magnética nuclear de próton
IgG	-	Imunoglobulina G
IgM	-	Imunoglobulina M
IR /RI	-	Índice de refração
LALLS	-	Espalhamento de luz em baixo ângulo
LB	-	Langmuir-Blodgett
LBL	-	Automontagem (<i>layer by layer</i>)
LLOX	-	Galactomanana de <i>L. leucocephala</i> oxidada
L929	-	Linhagem celular clone 929
M	-	Ácido manurônico
M_w	-	Massa molar ponderal média
M_n	-	Massa molar numérica média
Man	-	Manose
MEM	-	Meio mínimo essencial
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	-	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo
n	-	Índice de refração

N _{1s}	-	Nível de energia 1s do átomo de nitrogênio
NHS	-	Éster de biotina-N- hidroxisuccinato
P.A.	-	Para análise
PAA	-	Ácido poliacrílico
PAH	-	Poli(alilamina hidrociorada)
PBS	-	Tampão fosfato salino
PEI	-	Polymin [®] SNA
PEM	-	Multicamadas de polieletrólitos
PEO	-	Óxido de polietileno
PGA	-	Ácido poli-L-glutâmico
pI	-	Ponto isoelétrico
PLL	-	Poli-L-lisina
PSS	-	Poli(estireno sulfonato)
QCM - D	-	Microbalança de cristal de quartzo – Dissipação
RALLS	-	Espalhamento de luz em ângulo reto
r ²		Raio ao quadrado
R _g	-	Raio de giração
R _h	-	Raio hidrodinâmico
RGD	-	Arginina-glicina-ácido aspártico
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMS	-	Raiz quadrada média
RT-PCR	-	Reação em cadeia da polimerase - Transcrição reversa
SAM	-	Monocamadas automontadas
SEC	-	Cromatografia de exclusão por tamanho
SFB	-	Soro fetal bovino
SHA	-	Hemaglutinina de sedimentação
Si	-	Silício
SPM	-	Microscopias de varredura
Tan δ	-	Relação G''/G'
THF	-	Tetrahidrofurano
UV	-	Ultravioleta
UV-Vis	-	Ultravioleta-visível
VI	-	Viscosidade intrínseca

WHO	- Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
XPS	- Espectroscopia Fotoeletrônica de raios-X
Z	- Secção transversal
Zp	- Potencial zeta
$[\eta]$	- Viscosidade intrínseca
Δ	- Fase
α	- Constante de Mark-Houwink
δ	- Deslocamento químico
ΔD	- Variações na dissipação
Δf	- Variação da frequência
Δm	- Variação da massa
λ	- Comprimento de onda
μ	- Modo de cisalhamento do quartzo
ρ	- Densidade da massa do quartzo
Φ	- Ângulo de incidência
ψ	- Amplitude
Γ	- Quantidade de material adsorvido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 POLISSACARÍDEOS	1
1.1.1 Galactomananas	1
1.1.2 Alginato de sódio	5
1.2 NANOFILMES.....	8
1.2.1 Filmes por Langmuir-Blodgett	9
1.2.2 Monocamadas automontadas.....	10
1.2.3 Filmes por automontagem (<i>layer by layer</i> - LBL).....	12
1.2.3.1 Deposição de filmes LBL por imersão.....	12
1.2.3.2 Deposição de filmes LBL por <i>spray</i>	14
1.2.3.3 Deposição de filmes LBL por revestimento rotacional (<i>spin coating</i>)	15
1.2.4 Adsorção de proteínas, vírus e células sobre os nanofilmes.....	17
1.2.4.1 Concanavalina A	17
1.2.4.2 Albumina	18
1.2.4.3 Partículas virais	18
1.2.4.4 Células.....	19
1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	20
1.3.1 Elipsometria	20
1.3.2 Microscopia de força atômica	22
1.3.3 Microbalança de cristal de quartzo.....	25
1.3.4 Dicroísmo circular	29
1.3.5 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 FONTE DE AMOSTRAS UTILIZADAS	34
3.2 PURIFICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE LEUCENA	35
3.3 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO – QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS	35
3.3.1 Determinação da composição monossacarídica da galactomanana purificada	35
3.3.2 Análise elementar de galactomanana purificada	36

3.3.3 Análise por ressonância magnética nuclear de próton do alginato.....	36
3.3.4 Análise por GPC acoplado a multidetectores (RI, LALS, RALS, Viscosimétrico e UV) da galactomanana purificada, do alginato e da quitosana	36
3.3.5 Análises reológicas das misturas galactomanana purificada-alginato	37
3.3.6 Análise por espectroscopia de fluorescência utilizando sonda de pireno das soluções de galactomanana purificada e de alginato	38
3.3.7 Dicroísmo circular da solução de galactomanana, de alginato e das misturas galactomanana-alginato e galactomanana-alginato-albumina	38
3.3.8 Obtenção de derivados de galactomanana purificada, de albumina e de alginato marcados por sondas fluorescentes e análises por microscopia de fluorescência	39
3.3.9 Determinação do potencial zeta dos polímeros	40
3.4 ENSAIO BIOQUÍMICO CELULAR	40
3.4.1 Análise de citotoxicidade da galactomanana purificada e do alginato	40
3.5 FORMAÇÃO E ANÁLISES DOS FILMES.....	41
3.5.1 Preparo das lâminas de silício amino-funcionalizadas ou não	41
3.5.2 Obtenção de filmes de galactomanana purificada em monocamada	42
3.5.3 Obtenção de filmes contendo a mistura galactomanana-alginato em multicamadas...	42
3.5.4 Acompanhamento do crescimento dos filmes de monocamadas e multicamadas por elipsometria.....	44
3.5.5 Acompanhamento do crescimento de filmes multicamadas através da micro-balança de cristal de quartzo.....	45
3.5.6 Análises da superfície dos filmes por microscopia de força atômica.....	46
3.5.7 Análises da superfície dos filmes monocamadas por Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X	46
3.6 APLICAÇÕES DOS FILMES GALACTOMANANA PURIFICADA.....	47
3.6.1 Interação dos filmes de galactomanana purificada com proteínas	47
3.6.2 Interação dos filmes de galactomanana purificada com partículas virais.....	47
3.6.3 Interação dos filmes de polieletrólitos em multicamadas com células HeLa	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 COMPOSIÇÃO DA GALACTOMANANA E DO ALGINATO.....	49
4.1.1 Purificação e composição da galactomanana de sementes de Leucena.....	49
4.1.2 Análise elementar da galactomanana purificada	50
4.1.3 Análise da composição do alginato por espectroscopia de ¹ H-RMN	50
4.2 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS DE SOLUÇÕES.....	52

4.2.1 Determinação da massa molar ponderal numérica média, raios de giração e hidrodinâmico, viscosidade intrínseca, e constante de Mark-Houwink da galactomanana, do alginato e da quitosana	52
4.2.2 Análises por espectroscopia de fluorescência utilizando sonda de pireno de soluções de galactomanana e de alginato	57
4.2.3 Análises por dicroísmo circular da solução de galactomanana, de alginato e das misturas galactomanana-alginato e galactomanana-alginato-albumina.....	61
4.2.4 Análises por cromatografia de permeação em gel da mistura galactomanana-albumina	63
4.2.5 Análises por reologia da mistura galactomanana-albumina em diferentes pHs	65
4.2.6 Potencial zeta (Zp) das amostras de polieletólitos	71
4.3 ENSAIO BIOQUÍMICO CELULAR	73
4.3.1 Análise de citotoxicidade da galactomanana e do alginato	73
4.4 FORMAÇÃO, ANÁLISE E APLICAÇÃO DOS FILMES	75
4.4.1 Filmes de galactomanana em monocamada	75
4.4.2 Aplicações dos filmes de galactomanana em monocamada.....	80
4.4.2.1 Interação dos filmes de galactomanana com proteínas	80
4.4.2.1.1 Interação dos filmes com albumina	80
4.4.2.1.2 Interação dos filmes de galactomanana com a Concanavalina A	85
4.4.2.2 Interação dos filmes de galactomanana com o vírus da dengue.....	90
4.4.2.3 Interação dos filmes de galactomanana – Concanavalina A com vírus da dengue.....	94
4.4.3 Desenvolvimento de filmes multicamadas.....	98
4.4.3.1 Análises por microscopia de fluorescência da galactomanana e alginato em solução e em filmes multicamadas da mistura galactomanana-alginato	99
4.4.3.2 Filmes multicamadas de galactomanana-alginato/ poli(alilamina hidroclorada)	101
4.4.3.3 Filmes multicamadas de galactomanana e alginato / poli-L-lisina	107
4.4.3.4 Filmes multicamadas de galactomanana-alginato/quitosana	114
4.5 TESTES DE ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE OS FILMES MULTICAMADAS.....	119
5. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS	125

1. INTRODUÇÃO

1.1 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são uma das mais abundantes e diversificadas famílias de biopolímeros. A estrutura primária dessas macromoléculas varia em composição, sequência, massa molar, configuração anomérica, posição de ligações e densidade de carga. Essas variações podem originar muitas formas de estruturas químicas e de conformação, as quais refletem em diferentes propriedades, que são importantes em muitas aplicações. As de interesse comercial cobrem o espectro de produtos químicos corriqueiros até especialidades químicas lucrativas para usos médicos e de alta tecnologia (YALPANI, 1988). Como exemplos de polissacarídeos que podem ter essas aplicações, estão as galactomananas e os alginatos, que foram os modelos nesses estudos, e cujos trabalhos descritos na literatura são relatados a seguir.

1.1.1 Galactomananas

As galactomananas (GM) são polissacarídeos extraídos de sementes de leguminosas e de algumas fontes microbiológicas, como fungos (DEA; MORRINSON, 1975) e líquens (WORANOVICZ, 1997). Nas leguminosas, são encontradas em maiores quantidades nas sementes da família *Leguminosae* (REID, 1985) e em menores quantidades nas espécies das famílias *Palmae*, *Annonaceae*, *Convolvulaceae* e *Loganiaceae* (DEA; MORRINSON, 1975; DEY, 1978).

As que constituem polímeros de reserva estão presentes em endospermas de algumas plantas onde, durante a germinação, esse carboidrato é metabolizado para fornecer produtos para o crescimento da planta (SINGHA; OBERLY; TOWNSEND, 1987). A degradação da galactomanana no endosperma é feita pela ação combinada das enzimas α -galactosidase, β -mananase e β -manosidase manohidrolase (McCLEARY; AMADO; WAILEL, 1981). Portanto, dependendo da origem, podem ser encontradas com diferentes graus de substituição e massas molares, bem como em diferentes estruturas finas (WHISTLER, 1973).



FIGURA 1 – IMAGENS DA LEGUMINOSA *Leucaena leucocephala*
 FONTE: TROPICAL FORAGES (2011)

Estruturalmente (FIGURA 2), apresentam uma cadeia principal formada por unidades β (1 \rightarrow 4) D-manose, as quais podem ainda ser substituídas na posição 6 por α -D-galactose. A proporção de Man:Gal varia de acordo com a fonte de extração; porém, há uma predominância de D-manose (60-80%) sobre a D-galactose (40-20%) (WHISTLER, 1973).

De acordo com as propriedades físico-químicas que esses polissacarídeos apresentam, podem ser usados como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes e floculantes (VIEBKE; PICULELL, 1992; ZHAN *et al.*, 1993; SORVARI *et al.*, 1997), o que o faz um material de escolha em indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas e têxteis (SHOBHA *et al.*, 2005).

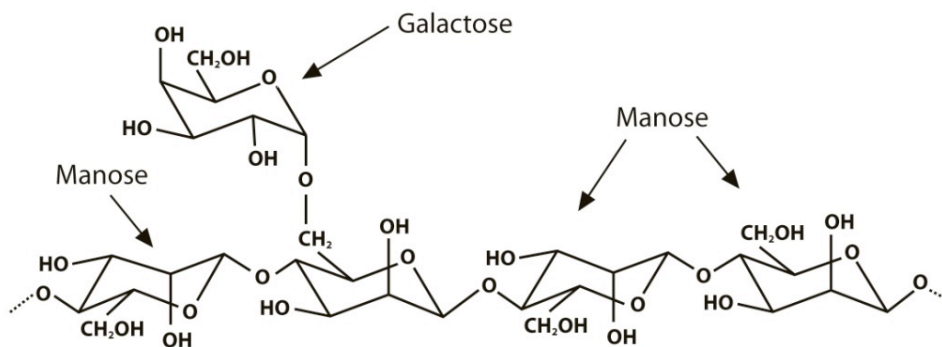


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA PARCIAL DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA E DE GOMA -TARA
 FONTE: SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES (2005)

Duas galactomananas são comercializadas em grandes quantidades: a goma-guar, a partir de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, e a alfarroba a partir de sementes de *Ceratonia siliqua*. Outras gomas como a tara e a *fenugreek* obtidas de sementes de *Caesalpinia spinosa* e *Trigorella Foenum-graecum*, respectivamente, também são comercializadas em menores quantidades (GLICKSMAN, 1986; HERALD, 1986; MAIER *et al.*, 1993).

A galactomanana contribui para a geleificação de soluções quando participa sinergicamente de interações com outros polissacarídeos como o ágar, carragenana e a xantana (VIEBKE; PICULELL, 1992; ZHAN *et al.*, 1993). O sinergismo depende do grau de substituição da cadeia principal (DEA; MORRISON, 1975). A habilidade das galactomananas interagirem com outros polímeros é, geralmente, influenciada pela menor quantidade de unidades de galactose (MORRIS, 1990).

Estudos com diferentes espécies de sementes foram realizados pelo Grupo de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná. Estruturas químicas de galactomananas de *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Schizolobium parahybum* foram estudadas por Ganter *et al.* (1993). Petkowicz *et al.* (1998) isolaram e estudaram as galactomananas obtidas de *Schizolobium amazonicum* e de *Schizolobium parahybum*. Ganter *et al.* (1995) estudaram a hidrólise enzimática da galactomanana de *M. scabrella*, Vargas-Rechia *et al.* (1995) extraíram e estudaram a galactomanana extraída de sementes de *Senna multijuga*.

Complexos de galactomananas extraídas de *Cassia fastuosa* e *Leucaena leucocephala* com íons Cu^{2+} foram analisados por Mercê *et al.* (1998). Noletto *et al.* (2009) avaliaram a toxicidade do complexo formado por duas galactomananas extraídas de *M. scabrella* com o oxovanádio.

As propriedades reológicas de geleificação, com outros polissacarídeos, de galactomanana de *C. fastuosa* e *L. leucocephala* foram estudadas por Amaral (1998). Interações entre galactomanana de *M. scabrella* e xantana foram avaliadas através de ensaios reológicos em meio aquoso e em meio contendo NaCl por Bresolin *et al.* (1997) e por Koop *et al.* (2009) que estudaram as propriedades reológicas de um gel hidro-alcóolico. Vendruscolo *et al.* (2009a) pesquisaram a aplicabilidade dessa mistura na liberação controlada de teofilina. A extração da galactomanana de *M. scabrella* em escala industrial foi explorada por Vendruscolo *et al.* (2009b). Lucyszyn (2004) testou a substituição parcial de ágar por

galactomananas extraídas de *L. leucocephala* e *C. fastuosa* para obtenção de géis, os quais foram aplicados para o cultivo de células vegetais (LUCYSZYN *et al.*, 2006) e parte do meio de cultura usado para regeneração de gomas de folhas de tabaco (LUCYSZYN *et al.*, 2007).

Estudos de galactomananas modificadas foram realizados por Lima *et al.* (1996), que descreveram o comportamento de derivados sulfatados de galactomananas de sementes de *Caesalpinia leiostachya*; e Germano (1996) analisou a atividade anticoagulante de galactomananas sulfatadas de *M. scabrella* e de *C. fastuosa*. A estrutura química da galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* e a sua modificação por oxidação foram estudadas por Souza *et al.* (2010, 2011). Propriedades biológicas foram analisadas por Pires *et al.* (2001), com a sulfatação da galactomanana extraída de sementes de *Senna macranthera* onde obtiveram um ativo heparinóico. Derivados oxidados e anfifílicos foram sintetizados para galactomananas de sementes de *L. leucocephala* (SIERAKOWSKI *et al.*, 2000). Esses e os oriundos da oxidação da galactomanana de *C. fastuosa* foram aplicados para obtenção de filmes como suporte para adesão de albumina (SIERAKOWSKI *et al.*, 2002). Ono *et al.* (2003) verificaram possíveis propriedades antivirais da galactomanana sulfatada de sementes de *M. scabrella* e *L. leucocephala* e Chrestani *et al.* (2009) avaliaram as propriedades anti-herpética e anti-rotaviral.

Estudos de Valenga *et al.* (2011) mostraram a interação entre a galactomanana de sementes de *L. leucocephala* com o alginato de sódio. Análises de viscosidade identificaram uma interação entre esses dois polissacarídeos quando se utilizou uma mistura de concentração final de 15 mg/mL, contendo 50% de galactomanana e 50% de alginato. Um aumento na viscosidade e a formação de gel foram verificados quando houve a adição de 45 mMol/L de íons cálcio ao sistema. A partir dessas misturas, nanopartículas foram feitas, nas quais foi incorporada a albumina (ALB). Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) demonstraram a formação de esferas de diâmetro de escala micro e nanométrica e, também, o encapsulamento da proteína. O encapsulamento da ALB nas esferas foi feito para avaliar possíveis aplicações do sistema ternário na liberação controlada de medicamentos e/ou na formação de cápsulas contendo proteína adsorvida. Outros trabalhos da literatura envolvendo os alginatos serão descritos a seguir.

1.1.2 Alginato de sódio

Alginatos são polissacarídeos estruturais extraídos de diferentes espécies de macroalgas, principalmente algas marrons, tais como, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (GOMBOTZ; WEE, 1998), onde constituem parte da matriz extracelular. Podem também ser encontrados em algumas bactérias, como na *Azobacter vinelandii*, e algumas espécies de *Pseudomonas* (MOE; SKJAAK-BRAEK; SMIDRØD, 1993) como polímero extracelular.

Quimicamente os alginatos são polissacarídeos aniônicos com uma estrutura (FIGURA 3) linear compreendida por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ de unidades de D-ácido manurônico e α -L-gulurônico (ZHANG; CHENG; YING, 2006), as quais podem variar nas proporções relativas e nas sequências, arranjadas em blocos ao longo da cadeia. A composição e tamanho desses blocos, juntamente com a massa molar determinam as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos. A variabilidade molecular depende do local fisiológico nas algas de onde o alginato foi extraído (GOMBOTZ; WEE, 1998). A sequência da composição dos monossacarídeos e a massa molar são importantes fatores para determinar as propriedades físicas de um gel formado pelos alginatos (LIEW *et al.*, 2006).

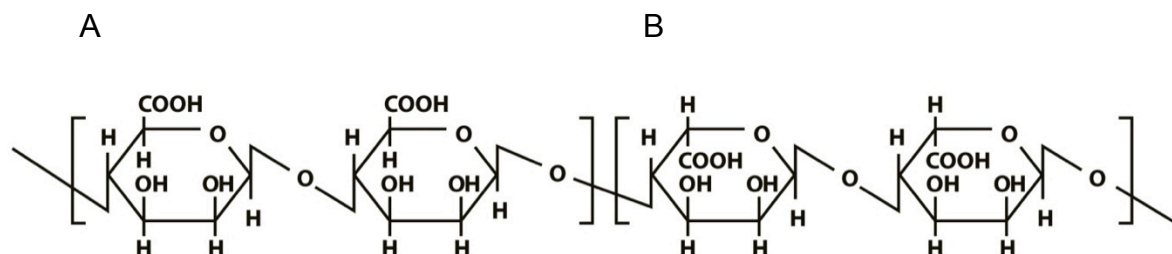


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO ALGINATO, A: UNIDADES DE ÁCIDO D-MANURÔNICO; B: UNIDADES DE ÁCIDO L-GULURÔNICO
FONTE: MACGREGOR; GREENWOOD (1980)

Em presença de íons divalentes, o alginato de sódio pode, através de um processo de ligação cruzada, trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, geleificando o meio em que se encontra. Os cátions monovalentes e o íon Mg^{2+} não induzem a essa geleificação. Íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem uso limitado por apresentarem certa toxicidade (GOMBOTZ; WEE, 1998). Na maioria das vezes, essa reticulação, isso é, ligações cruzadas entre

polímero e os íons, formando uma estrutura tridimensional é feita ao se trocar o íon Na^+ dos ácidos gulurônico com cátions divalentes formando uma estrutura do tipo caixa de ovo (FIGURA 4). Os cátions divalentes ligam-se aos blocos de ácidos α -L-gulurônico de uma maneira cooperativa que pode ter mais de 20 monômeros associados. Cada cadeia de alginato pode dimerizar para formar junções com muitas outras cadeias resultando na formação de um gel (GOMBOTZ; WEE, 1998).

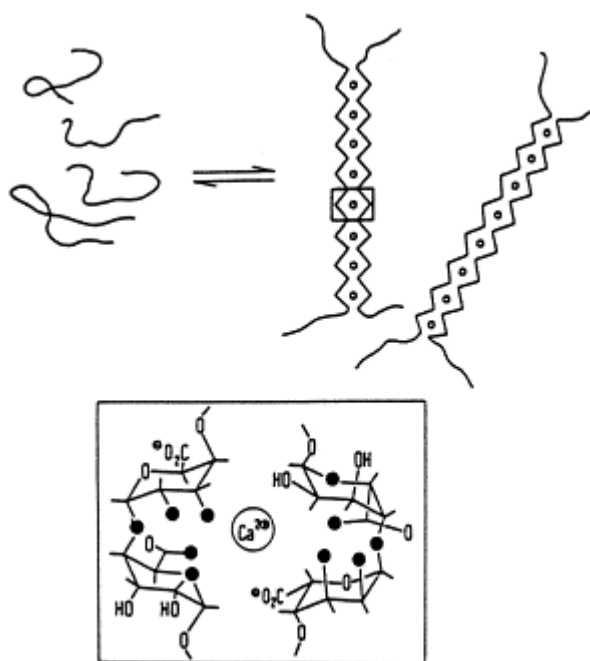


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA TIPO CAIXA DE OVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SEQUÊNCIAS POLI – L – GULURONATO DO ALGINATO RETICULADA COM ÍONS CÁLCIO
FONTE: REES (1981)

Géis podem ser formados ao gotejar uma solução de alginato de sódio em uma solução contendo cátions divalentes (OUWERX *et al.*, 1988). O diâmetro das partículas formadas é dependente do tamanho do diâmetro da agulha usada para gotejar a solução e da viscosidade da solução de alginato. Maiores diâmetros e viscosidades mais altas produzem partículas maiores. Os géis de alginato são estáveis entre uma faixa de temperatura de 0-100°C, apesar do seu módulo de rigidez diminuir com o aumento da temperatura (GACESA, 1988).

Indústrias farmacêuticas, biomédicas e biotecnológicas têm apresentado interesse no uso do alginato (SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003). Algumas propriedades exploradas são a capacidade de agir como espessante, geleificante e

agente coloidal (LIEW *et al.*, 2006). Além de propriedades de imunogenicidade (GOMBOTZ; WEE, 1998), de biocompatibilidade (EISELT *et al.*, 2000), bioadesão (PEPPAS; BURI, 1985) e de baixa toxicidade (SMIDSRØD; SKJAAK-BRAEK, 1990).

Aplicações cirúrgicas também podem ser feitas ao se utilizar o alginato em reparações de tecidos celulares (CHO; OH; LEE, 2010), em hemorragias capilares e tratamento de queimaduras (BLAINE, 1947). Géis podem ser aplicados na superfície ocular, onde o α -L-gulurônico complexa com os íons cálcio presentes na lágrima e atuam na liberação controlada de medicamentos oculares (COHEN *et al.*, 1997).

Em liberação controlada de medicamentos já foi descrito o uso de sistemas que contenham alginato de sódio (GOMBOTZ; WEE, 1998; VEDHA; BRAHMA; SAMYUKTHA, 2010). Há estudos, também, em que utilizam o alginato para liberação controlada de medicamentos por via oral, em que esse sistema apresenta uma resistência ao ácido gástrico (STOCKWELL; WALKER, 1986).

Atualmente, é ampla a utilização de micro e nanoesferas de alginato associadas com proteínas. Interações entre a albumina e alginato foram descritas por Neiser, Draget e Smidsørt (1999) e Leonard *et al.* (2004). Estudos de partículas contendo insulina foram realizados por Silva *et al.* (2006) e Sarmento *et al.* (2006), assim como interações em micro e nanopartículas de uma mistura de alginato/quitosana (PAN *et al.*, 2002; AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004) e alginato/agarose (SAKAI; HASHIMOTO; KAWAKAMI, 2006). Filmes de alginato ligados por ligações cruzadas com albumina foram estudados como base para sensores biomoleculares (BAYER; HERRERO; PEPPAS, 2011) ao testar o reconhecimento da proteína ligada ao filme.

A adesão celular foi testada, por exemplo, com células para regeneração cardíaca, em que foi usado o alginato ligado a peptídeos (SAPIR; KRYUKOV; COHEN, 2011), com condrócitos, que aderiram ao alginato ligado à aminoácidos (Arginina-Glicina-Asparagina) (JEON *et al.*, 2010) e a mistura de alginato/quitosana (LI *et al.*, 2008).

Estudos de alginato na formação de filmes finos com multicamadas também já foram descritos em combinação com poli-L-lisina (ELBERT; HERBERT; HUBBEL, 1999); com quitosana (GASEROD; SMIDSRØD; SKJAAK-BRAEK, 1998) e com carragenana (XU; BARTLEY; JOHNSON, 2003). A seguir, serão descritas algumas características e técnicas envolvendo a obtenção de nanofilmes.

1.2 NANOFILMES

Conforme a classificação métrica há principalmente dois tipos de filmes, os filmes finos, cuja espessura média possui valores entre 50 a 200 nm e os ultrafinos, ou também chamados de nanofilmes, que possuem uma espessura inferior a 10 nm. Os nanofilmes podem ainda se apresentar como nanoestruturados, através dos quais é possível controlar a espessura e as propriedades em nível molecular, e que tem grande importância entre as tecnologias modernas. As dimensões moleculares dos filmes ultrafinos restringem o uso de moléculas específicas que podem adsorver em sua superfície.

No campo de biomateriais, várias estratégias são usadas para tornar o material utilizado em biologicamente ativo. Um dos métodos utilizados para a incorporação de biomoléculas em um biomaterial consiste em direcioná-las diretamente na superfície de revestimento do material (CHLUBA *et al.*, 2001). A formação de filmes finos sobre superfícies sólidas tem grande importância tecnológica, como no desenvolvimento de biossensores (DAVIS; HIGSON, 2005), imunoensaios (OSTROFF *et al.*, 1998) e em aplicações biomédicas, ao revestir e funcionalizar biomateriais, através da deposição de proteínas (CARUSO *et al.*, 1997), DNA ou outras nanopartículas (ZHANG *et al.*, 2005).

Em biossensores, a aplicação dos filmes finos e ultrafinos é amplo e variado. Geralmente, as análises realizadas pelos biossensores são simples e muitas vezes, podem ser feitas sem a utilização de reagentes. Para qualquer sensor, a velocidade da resposta é importante, assim como a difusão das moléculas do analito que devem reagir com o componente ativo sensível e ainda, o produto dessa reação deve ser visível. Portanto, quanto mais fina for a camada do filme, menos tempo será necessário para realizar as análises (DAVIS; HIGSON, 2005).

Filmes finos permitem adsorver em seu interior moléculas de importância biológica, como proteínas, peptídeos, lipopolissacarídeos e medicamentos. A adsorção de polissacarídeos em substratos sólidos fornece uma boa base para a imobilização dessas biomoléculas.

Algumas estratégias para a obtenção de filmes finos podem ser adotadas. Assim, a deposição por Langmuir-Blodgett (LB), monocamadas automontadas

(SAM) e técnicas de automontagem (*layer by layer* - LBL) são os exemplos mais conhecidos para a sua obtenção.

1.2.1 Filmes por Langmuir-Blodgett

A técnica de LB foi a primeira que conseguiu formar filmes em escala nanométrica. Trabalhos iniciais sobre estruturas de monocamadas foram desenvolvidos por Langmuir (1916) que espalhou moléculas anfifílicas em superfície de água. Posteriormente, em colaboração com Katherine Blodgett, transferiram essas monocamadas para uma superfície sólida (BLODGETT; LANGMUIR, 1937).

Na técnica LB, inicialmente, o material é dissolvido em solvente volátil e espalhado sobre uma subfase aquosa (geralmente água purificada). O solvente é evaporado, deixando uma camada desordenada de moléculas anfifílicas. Através de barreiras móveis, a camada monomolecular na interface ar/água denominada filme de Langmuir é comprimida até um estado condensado. Pode-se realizar a transferência do filme para um substrato sólido por meio de imersão e da retirada desse substrato. Imersões e retiradas subsequentes do mesmo substrato permitem produzir nanoestruturas com mais de uma camada e diferentes ordenamentos (DÚRAN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Tem-se assim um filme com espessura controlada no nível molecular, pelo número de camadas ou mesmo pelo tamanho das moléculas em cada camada.

Com a técnica de LB pode-se promover um nível de controle de posição e orientação das moléculas, que não é possível em outras técnicas (CLEMENTE-LEON *et al.*, 2005). Por isso, a técnica LB é a metodologia de escolha para produção de filmes com arquiteturas específicas, tais como quimiosensores, dispositivos eletrônicos e filmes baseados em lipídeos e derivados (ULMAN, 1991; TALHAM, 2004; REICHART; BRUCKNER; JOSEPH, 1987). Apesar de ser tradicionalmente usada para organizar moléculas orgânicas anfifílicas, foi mostrado que uma grande variedade de complexos inorgânicos com usos magnéticos e de condutividade podem ser feitos a partir da técnica LB.

As desvantagens dessa técnica são requerer um equipamento especial, a Cuba de Langmuir (FIGURA 5) e apresentar algumas limitações com relação ao tamanho do substrato, topologia e também a qualidade e estabilidade do filme, pois

algumas biomoléculas resultam de uma atração física fraca dentro desses filmes (DECHER, 1997). Além de ser uma técnica restrita às moléculas anfifílicas, capazes de formar camadas em interfaces líquido-vapor (ZASADZINSKI *et al.*, 1994), e que podem também ser embebidas dentro do filme.

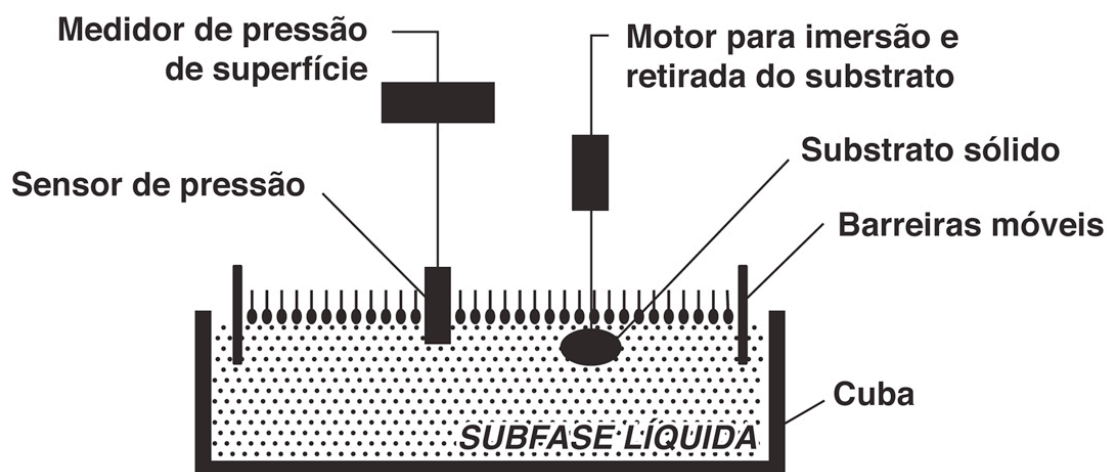


FIGURA 5 - CUBA DE LANGMUIR E SEUS ACESSÓRIOS UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DE FILMES DE LANGMUIR E LB
FONTE: DÚRAN; MATTOSO; MORAIS (2006)

1.2.2 Monocamadas automontadas

As monocamadas automontadas, ou do inglês, *self-assembled monolayers* (SAM), são outro tipo de formação de filmes finos, mais especificamente, filmes orgânicos (FIGURA 6). SAMs são agrupamentos moleculares ordenados formados por moléculas anfifílicas em superfície sólida, que se formam espontaneamente em uma fase de solução ou em fase de vapor. O método é simples e há uma grande interação entre o adsorvente e o substrato, já que as moléculas orgânicas são quimioadsorvidas sobre a superfície. Ocorre uma interação cadeia-cadeia, envolvendo forças hidrofóbicas e van der Waals que garantem o empacotamento e a estabilidade da monocamada (ISRAELACHVILLI, 1994). Geralmente, SAMs com diferentes grupos terminais podem ser preparadas, o que aumenta a variedade de aplicações para esses filmes. Além disso, SAMs podem ser montadas em diferentes objetos, com diferentes formas e tamanhos, e não apenas em superfícies planas (MARTIN *et al.*, 1999; AZZARONI *et al.*, 2004).

Atualmente, as SAMs mais estudadas compreendem em monocamadas formadas por alcanotíóis ou camadas com compostos contendo enxofre em superfícies de metais ou semicondutores. A sua principal aplicabilidade é no campo de sensores, na prevenção de corrosão, construção de nanodispositivos, implantes médicos e na farmacologia (LOVE *et al.*, 2005; GATES *et al.*, 2005). Em todas essas aplicações, as SAMs atuam como interfaces entre materiais de diferentes propriedades físicas e químicas: em um lado metais, semicondutores ou materiais inorgânicos, do outro lado materiais orgânicos e biológicos (VERICAT; VELA; SALVAREZZA, 2005).

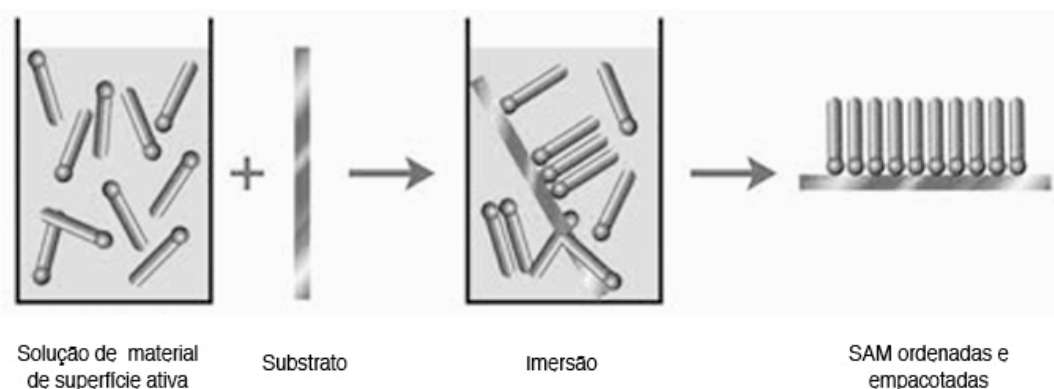


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE SAM, EM QUE O SUBSTRATO É COLOCADO EM UMA SOLUÇÃO CONTENDO MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS. APÓS CERTO TEMPO, MONOCAMADAS SÃO FORMADAS ESPONTÂNEA E ORDENADAMENTE

FONTE: Adaptado de PHYSICAL INORGANIC CHEMISTRY, TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN (2011)

Na técnica de SAM, uma das desvantagens é que poucos materiais biológicos podem ser adicionados aos filmes devido à natureza das monocamadas, pois as SAMs são fabricadas pela adsorção de tíóis em substratos de metal nobre ou por silanos em superfícies de sílica, além de formar filmes pouco estáveis em condições biológicas ambientais (TANG *et al.*, 2006).

Apesar das técnicas LB e SAM terem capacidades de imobilizar proteínas e células em superfícies e serem usadas em biocatálise, liberação de medicamentos ou na engenharia de tecidos (MRKSICH, 2000; MRKSICH; WHITESIDES, 1996; EROKHIN, 2002; SENARATNE; ANDUZZI; OBER, 2005), ambas possuem desvantagens intrínsecas que as limitam para o uso no campo da biologia.

1.2.3 Filmes por automontagem (*layer by layer* - LBL)

Há aproximadamente 20 anos, a técnica LBL foi introduzida por Decher, Hong e Schimtt (1992) como um novo método de fabricar filmes finos e funcionalizar superfícies, planares ou não. Além de filmes LBL, pode-se obter também, por exemplo, nanopartículas (SCHNEIDER, G., 2006), nanotubos (Al *et al.*, 2003a) e colóides (WANG; ANGELATOS; CARUSO, 2008).

A LBL é uma técnica que independe da natureza, da topologia e do tamanho do substrato, onde diferentes tipos de substratos podem ser utilizados para o crescimento de multicamadas. Essa técnica utiliza a atração eletrostática entre compostos de cargas opostas. A FIGURA 7 explica o processo de formação das camadas, em que uma camada de poliânion é depositada sobre uma de uma de policação. Uma atração faz com que as moléculas sejam adsorvidas umas sobre as outras e, com uma repetição cíclica, pode se ter a formação de um filme com várias camadas.

As forças de formação dos filmes de LBL não estão limitadas às interações eletrostáticas. O crescimento de filmes baseados em ligação de hidrogênio (STOCKTON; RUBNER, 1995), transferência de cargas (SHIMAZAKI *et al.*, 1997), ligações covalentes (BRYNDA; HOUSKA, 1996), reconhecimento biológico (ANZAI *et al.*, 1999) e interações hidrofóbicas (KOTOV, 1999) já foram demonstrados.

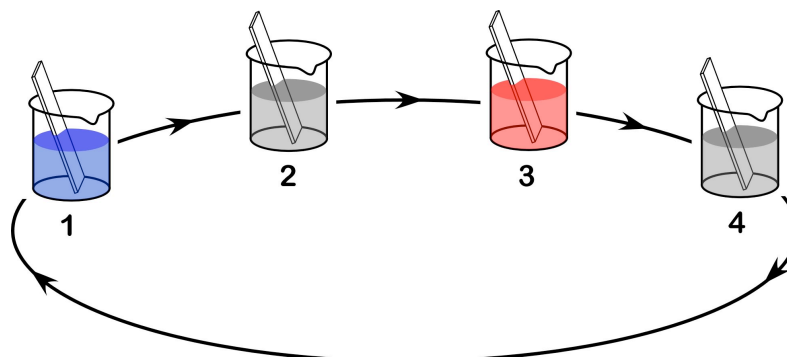
Como a maioria dos biomateriais apresenta cargas em sua superfície, esses são facilmente adsorvidos em multicamadas de LBL, algo já demonstrado, por exemplo, com filmes de proteínas (LVOV *et al.* 1995), DNA (LVOV; DECHER; SUKHORUKOV, 1993) e polissacarídeos carregados (ZHANG *et al.*, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010).

1.2.3.1 Deposição de filmes LBL por imersão

Há diferentes maneiras de se fazer um filme LBL, porém todas simples. A FIGURA 7A mostra a técnica de imersão, em que o substrato é imerso em uma solução contendo o polieletrólito que se deseja adsorver sobre a placa. Após certo tempo para adsorção do polieletrólito, esse substrato, contendo uma monocamada é

lavado e imerso na solução do outro eletrólito. Lava-se novamente e repete-se o ciclo na proporção de quantas camadas se desejarem ter.

A



B

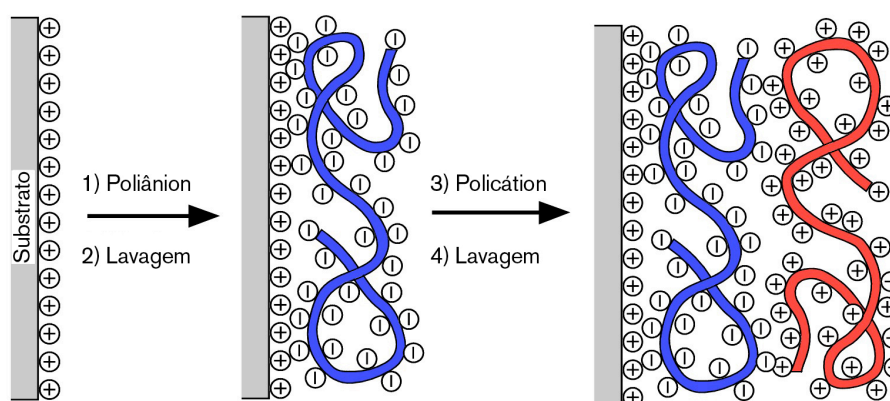


FIGURA 7 - (A) ESQUEMA DO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO POR IMERSÃO DE DUAS SOLUÇÕES DIFERENTES. ETAPAS 1 E 3 DEMONSTRAM DEPOSIÇÃO DE POLIÂNION E DE POLICÁTION, RESPECTIVAMENTE; ETAPAS 2 E 4 REPRESENTAM LAVAGEM. ESSAS 4 ETAPAS SÃO OS PROCESSOS BÁSICOS DA DEPOSIÇÃO. (B) ILUSTRAÇÃO SIMPLIFICADA DE DUAS ETAPAS DE ADSORÇÃO, INICIANDO COM UM SUBSTRATO POSITIVO E UMA SOLUÇÃO NEGATIVA

FONTE: Adaptado de DECHER (1997)

A imersão é a técnica mais usada em LBL devido à facilidade das etapas e materiais necessários para realizá-la. Há alguns parâmetros que devem ser otimizados para garantir a qualidade e eficiência da técnica como o tempo de imersão nos polieletrólitos, o tempo de lavagem, a concentração das soluções, a força iônica, o pré-tratamento do substrato, a temperatura, o pH e o processo de secagem (DUBAS; SCHLENOFF, 1999; SILVA *et al.*, 2008; SILVA; MIRANDA, 2009). Apesar dessas vantagens, a técnica de imersão tem algumas limitações, por exemplo, dependendo da cinética de adsorção, o tempo de imersão pode ser muito longo, ou ainda, alguns materiais podem desorver durante a lavagem, contaminando as soluções.

1.2.3.2 Deposição de filmes LBL por *spray*

A deposição de filmes LBL por *spray* foi introduzida por Schlenoff, Dubas e Farhat (2000) e consiste em vaporizar soluções poliméricas em um substrato fixado verticalmente (FIGURA 8). O tempo de deposição reduz de aproximadamente 20 minutos/camada obtida em imersão, para até 5 segundos/camada (IZQUIERDO *et al.* 2005). Os filmes obtidos pela técnica LBL de *spray* são mais finos, porque as gotas hidrodinâmicas, que são depositadas no substrato e que irão aderir às camadas, parecem ter um estado de adsorção diferente daquele obtido quando o substrato simplesmente é imerso na solução. Assim como nas outras técnicas, uma etapa de lavagem é necessária entre a deposição das soluções.

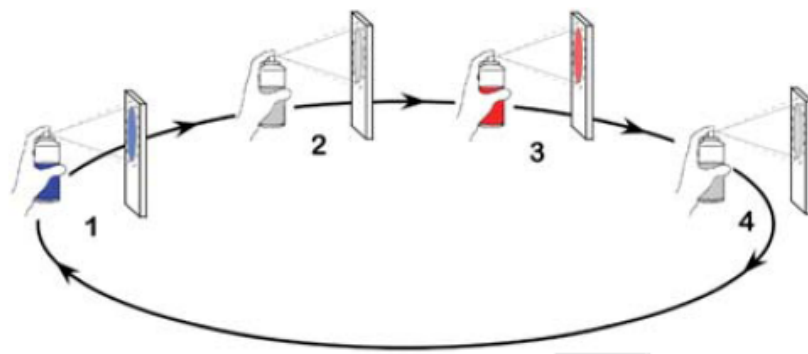


FIGURA 8 – PROCESSO DE DEPOSIÇÃO LBL ATRAVÉS DE *SPRAY*. 1 INDICA DEPOSIÇÃO DE POLIÂNION, 2 E 4 INDICAM A LAVAGEM E 3 DEPOSIÇÃO DE POLICÁTION
FONTE: BENKIRANE-JESSEL *et al.* (2007)

Os filmes preparados por LBL *spray* são mais estratificados, mais finos e menos rugosos do que os preparados por imersão (KOLASINSKA, 2009). A desvantagem com relação à técnica de imersão é que a cada *spray* há perda de material que não adsorve no substrato o qual é drenado da superfície. Porém, a redução do tempo de deposição e a facilidade fazem com que essa metodologia seja aplicada em diversos produtos, como filmes de polieletrólitos (MJAHERD *et al.*, 2009), nanopartículas (FÉLIX *et al.*, 2009), nanofios (SUZUKI *et al.*, 2009), íons metálicos (KROGMAN; LYON; HAMMOND, 2008), enzimas (BRUENING; DOTZAUER, 2009) e células (GROSSIN, 2009).

1.2.3.3 Deposição de filmes LBL por revestimento rotacional (*spin coating*)

O revestimento rotacional (*spin coating*) para produzir filmes LBL foi inicialmente introduzido em 2001 (CHO *et al.*, 2001; CHIARELLI *et al.*, 2001). Essa é uma técnica simples em que uma solução contendo amostra é gotejada na superfície de um substrato, que está colocado sobre um anteparo rotacional (FIGURA 9). O sistema é então girado a uma dada velocidade angular durante certo período de tempo. Através da força centrífuga, a amostra é espalhada sobre o substrato formando um filme fino, homogêneo e com espessuras reproduzíveis e controladas. Dessa maneira, pode-se adicionar ao filme, quantas camadas se desejarem. A espessura do filme é controlada pela concentração do polímero em solução, massa molar do polímero (SCHUBERT, 1997; SCHUBERT; DUNKEL, 2003), velocidade angular (HALL; UNDERHILL; TORKELOSON, 1998), tempo de rotação (GU; BULLWINKEL; CAMPBELL, 1996) e taxa de evaporação do solvente (WALSH; FRANCES, 2003).

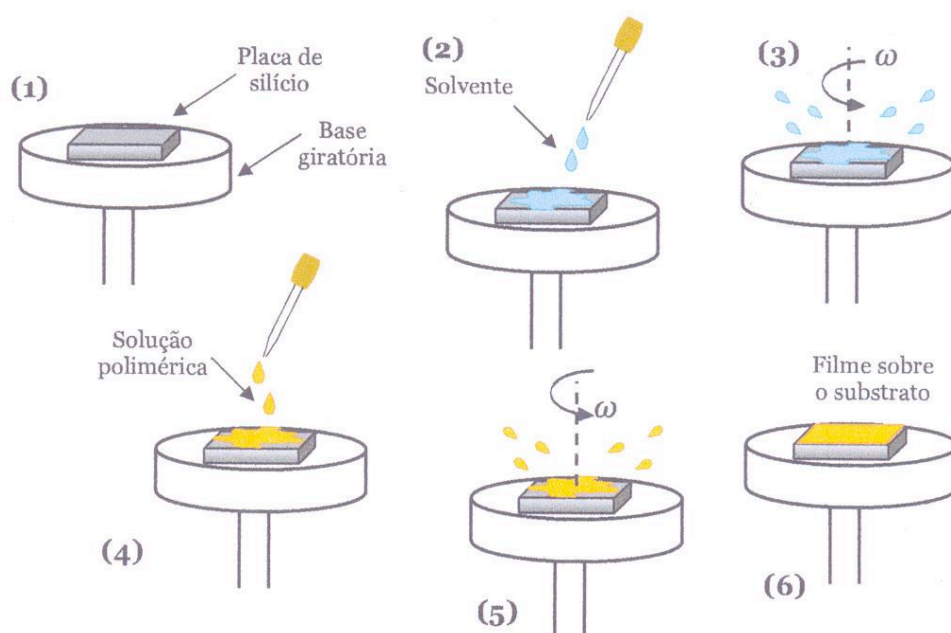


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARADO DE FILMES FINOS E HOMOGÊNEOS POR REVESTIMENTO ROTACIONAL (*SPIN COATING*) SOBRE LÂMINAS DE Si
FONTE: KOSAKA (2007)

Por haver pouco tempo de contato entre a solução e o substrato, essa técnica permite uma deposição de quantidades controladas de material mais rápida do que a técnica de imersão. Além disso, os filmes produzidos por *spin* LBL são mais ordenados internamente do que os filmes de imersão (VOZAR *et al.*, 2009).

Como uma poderosa técnica de modificação e funcionalização de superfícies, a LBL não apresenta limitações quanto ao uso de substratos, contanto que a superfície seja capaz de interagir com a primeira camada depositada. Óxido de silício é um dos substratos mais usados por possuir grupos silanol, que permitem adsorção da primeira camada, pelas propriedades refractivas que facilitam a medida de características dos filmes e por ser a superfície lisa, o que permite o estudo por técnicas de imagens. Vidros ou quartzo também podem ser substratos, permitindo acompanhar o crescimento do filme por técnicas espectroscópicas de UV-Vis (DECHER; HONG; SCHIMTT, 1992). O ouro (WANG *et al.*, 2009), a mica (KUMARA; TRIPP; MURALIDHARAN, 2007) e a bolacha de silício (YANG *et al.*, 2009) são outros exemplos de superfícies usadas.

A LBL é uma técnica amplamente empregada em diversos campos utilizando diversos materiais. Já foi descrita a incorporação em seus filmes de vesículas de lipídeos (MORAES *et al.*, 2010); polipeptídios (BOULMEDAIS *et al.*, 2003); ácidos nucleicos ou DNA (BLACKLOCK *et al.*, 2010) e proteínas (MARTINS *et al.*, 2010). Também foi estudado o emprego de LBL para mimetizar estruturas e funções de materiais naturais, como conchas do mar que possuem fortes propriedades mecânicas (KOTOV *et al.*, 1997), as superfícies super-hidrofóbicas similares as da folha de lótus (ZHAI *et al.*, 2004), membranas artificiais fotossintéticas (HE *et al.*, 1998) e biomotores com a motilidade de actina-miosina (JABER; CHASE; SCHLENOFF, 2003). A partir de filmes de LBL também foram feitos biossensores com enzimas (CALVO; DANILOWICZ; WOLOSUK, 2002; CARUSO *et al.*, 1997), proteínas (HE; HU, 2004), ácidos nucleicos (RUSLING, 2004), compostos inorgânicos e orgânicos (LIU; KURTH; VOLKMER, 2002; RAM *et al.*, 2005). As aplicações desses filmes foram testadas na área biológica, para liberação controlada de medicamentos (ARIGA *et al.*, 2011) e adesão celular (JESSEL *et al.*, 2003).

Na área de biopolímeros, já foi descrito na literatura a formação de filmes finos de alginato com compósitos (PONGJANYAKUL; PUTTIPIPAKHACHORN,

2008); com quitosana (MAURSTAD *et al.*, 2008); com uréia (HAIDARA; AYDA; VIALIER, 2004); com poli-L-lisina (MJAHEED *et al.*, 2008); no encapsulamento de dextrana (SRIVASTAVA; McSHANE, 2005). A seguir, serão descritos alguns estudos descritos na literatura envolvendo a adsorção de proteínas e de células sobre filmes finos constituídos de carboidratos.

1.2.4 Adsorção de proteínas, vírus e células sobre os nanofilmes

1.2.4.1 Concanavalina A

As proteínas podem integrar a superfície do filme sem haver, necessariamente uma ligação covalente com o polieletrólito. Um exemplo de proteína utilizada na funcionalização desses filmes é a Concanavalina A (ConA). A ConA é uma lectina extraída de sementes da leguminosa *Concanavalina ensiformis*, de feijão de porco, com massa molar do tetrâmero de aproximadamente 100.000 g/Mol. As lectinas são uma família de proteínas que possuem 4 sítios iguais de ligação com açúcares como com a D-manose e com a D-glucose (SATO; KODAMA; ANZAI, 2005), propriedade essa muito explorada, principalmente, no campo de biossensores. As constantes de ligação da ConA para a D-glucose foi relatada como sendo $0,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e para a D-manose como $2,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (SCHWARZ *et al.*, 1993; MANDEL; KISHORE; BREWER, 1994). Porém, as ligações com os açúcares requerem a presença de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} .

A interação carboidrato-lectina tem sido usada em técnicas de imunossensores para identificar patógenos e espécies virais que expressem carboidratos em sua superfície. Por exemplo, técnicas imunoenzimáticas (ELISA) usando lectinas imobilizadas foram desenvolvidas para detecção do vírus humano de imunodeficiência (HIV) (SAIFUDDIN *et al.*, 2000). Esses métodos são baseados na seletividade das lectinas, como a ConA em se ligar as glicoproteínas presentes no envelope das superfícies dos antígenos (REVELL *et al.*, 1998).

Trabalhos anteriores mostraram a adsorção de ConA em uma monocamada composta pela mistura de xilogucana e alginato de sódio, na qual houve adsorção irreversível da proteína em pH 5, formando uma monocamada homogênea (PEREIRA *et al.*, 2008). Outro trabalho mostrou a adsorção de ConA sobre goma de

cajeeiro, previamente adsorvida em uma camada amino-terminal (MACIEL *et al.*, 2007), em que apesar da goma ser predominantemente composta por galactose, a presença de glucose na cadeia lateral favoreceu a interação com a ConA. Partículas híbridas de poli(metil-metacrilato)/carboximetilcelulose (CASTRO; KAPPL; PETRI, 2005) foram desenvolvidas e fixadas em cantilever de microscopia de força atômica e a interação destas moléculas com os filmes monocamadas de ConA formadas sobre o silício foram estudadas para entender mais sobre interações não-específicas da proteína.

1.2.4.2 Albumina

Outro exemplo de proteína utilizada na adsorção e formação de filmes finos é a albumina (ALB) (YAMPOLSKAYA; PLATIKANOV, 2006). A albumina sérica é a proteína mais abundante na circulação sanguínea. É uma proteína globular, formada por uma cadeia de polipeptídeo, com 585 aminoácidos, e é essencial para manter a pressão osmótica, para transportar hormônios, ácidos graxos, medicamentos e compostos hidrofóbicos. O seu estudo pode ser usado como uma base para pesquisa em filmes finos de modelos contendo multicamadas com biomoléculas adsorvidas, o que fornece informações de aplicação, estabilidade e funcionalização de um biosistema (CARUSO; MÖHWALD, 1999a). Sierakowski *et al.* (2007) estudaram filmes feitos de monocamada das galactomananas oxidadas de *C. fastuosa* e de *L. leucocephala*, nos quais foi depositada a proteína BSA em função de diferentes pHs, obtendo um máximo de deposição no ponto isoelétrico da proteína.

1.2.4.3 Partículas virais

As partículas virais também adsorvem aos filmes formados originando dispositivos rápidos para diagnósticos de doenças. Um exemplo é a adsorção dos diferentes sorotipos do dengue. O vírus da dengue (DENV), membro da família *Flaviridae* gênero *Flavivirus*, é o responsável pela mais importante doença humana transmitida por mosquitos (REY, 2003). A incidência da febre epidêmica tem aumentado ao longo dos anos, tendo uma estimativa de mais de 100 milhões de

casos ocorrendo anualmente por todo mundo (MONATH, 1994). Além disso, a forma mais severa da doença, a dengue hemorrágica, tem tido aproximadamente 500.000 casos por ano em todo mundo (WHO, 2011).

Há quatro sorotipos conhecidos para o vírus da dengue: Dengue 1 (DENV-1), Dengue 2 (DENV-2), Dengue 3 (DENV-3) e Dengue 4 (DENV-4) e, acredita-se que a dengue hemorrágica resulte de uma infecção sequencial de dois sorotipos diferentes, em um processo conhecido como anticorpos de reforço dependentes de infecção (ADE) (HALSTEAD, 1997). Portanto, formas de diagnósticos rápidos e específicas para cada tipo de vírus são importantes para o prognóstico e tratamento do paciente. Várias técnicas podem ser utilizadas no diagnóstico sorológico do vírus, entre elas a inibição de hemaglutinação, fixação de complemento, neutralização e ELISA; que detectam anticorpos das classes IgM e IgG. No entanto, esses testes não discriminam qual o sorotipo envolvido na doença.

Xiloglucana de sementes de *Tamarindus indica* e alginato de sódio foram usados como suporte para imobilização de partículas do vírus da dengue, sendo o sorotipo DENV-4 o que apresentou a mais fraca adsorção (PEREIRA *et al.*, 2008).

Assim, os estudos da adsorção de proteínas em superfícies sólidas e das características dos filmes finos formados podem fornecer dados para desenvolvimento de dispositivos. Além do que, informações sobre ligações específicas entre carboidratos e proteínas podem ser usadas para maiores estudos em adesão celular e reconhecimento de patógenos pelo sistema imune através dos carboidratos presente na superfície das células (CASTRO; KAPPL; PETRI, 2005).

1.2.4.4 Células

As propriedades das superfícies de substratos podem controlar efetivamente o comportamento da adesão de células, e essa adesão é um dos pontos críticos na preparação de dispositivos biomédicos (TANG *et al.*, 2006). Muitos tecidos celulares são simplesmente não viáveis depois que dissociados ou suspensos em um fluido (DISCHER; JANMEY; WANG, 2005) sendo essa uma das razões em se estudar a adesão das células.

A resposta celular ou uma interação com um biomaterial é modulado pelo fenômeno de adesão (LINEZ-BATAILLON *et al.*, 2002). A adesão celular fornece

uma grande contribuição para manutenção de uma estrutura de tecido, para a promoção da migração celular e transdução da informação sobre o microambiente celular através da membrana plasmática (HUMPHRIES, 2001).

A aderência das células a sólidos varia conforme a rigidez, topografia e espessura dos substratos (DISCHER; JANMEY; WANG, 2005). Algumas estratégias foram desenvolvidas para promover a adesão celular, como obtenção de filmes por reticulação pelo calor (YANG; MENDELSON; RUBNER, 2003), usando o composto químico carbodiimida (RICHERT *et al.*, 2004a), acrescentando aos filmes peptídeos (PICART *et al.*, 2005) ou moléculas de açúcar (SCHNEIDER, A. *et al.*, 2006). Alguns estudos comparativos com células epiteliais mostraram que células apresentam comportamento de adesão difuso e dinâmico quando depositados sobre substratos de gel macios e com baixo grau de ligações cruzadas, e comportamento estável e focalizado quando depositado sobre géis rígidos e com alto grau de ligações cruzadas, típico de quando as células estão aderidas em vidro (PELHAM; WANG, 1997).

A adesão celular em filmes formados por polímeros como poli-L-lisina, ácido poli-L-glutâmico, ácido algínico e ácido poli-galacturônico (PICART *et al.*, 2005), ácido hialurônico (RICHERT *et al.*, 2004b; SCHNEIDER *et al.*, 2007), quitosana (RICHERT *et al.*, 2004c) foram estudados.

O desenvolvimento e o crescimento de filmes podem ser efetuados por algumas técnicas analíticas descritas a seguir.

1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

1.3.1 Elipsometria

A técnica de elipsometria (AZZAM; BASHARA, 1977) consiste em medir a mudança do estado de polarização da luz após a reflexão, a partir de uma superfície isotrópica refletora. Um elipsômetro é um equipamento simples e sensível, que mede a espessura de um filme fino a partir de uma única camada até várias camadas. Os elipsômetros podem operar usando múltiplos ângulos e comprimentos de onda para determinar a espessura do filme de uma maneira muito sensível, alcançando uma escala de ângstroms (Å). A FIGURA 10 mostra os elementos básicos que compõem o elipsômetro: a luz polarizada, dois polarizadores e um detector. A luz polarizada

emitida interage com superfície óptica e há um deslocamento de fase de ambos os componentes, paralelo e perpendicular, do plano de incidência. A quantidade refletida depende das propriedades ópticas do material de base, bem como da espessura e do índice de refração dos filmes (OSTROFF *et al.*, 1998).

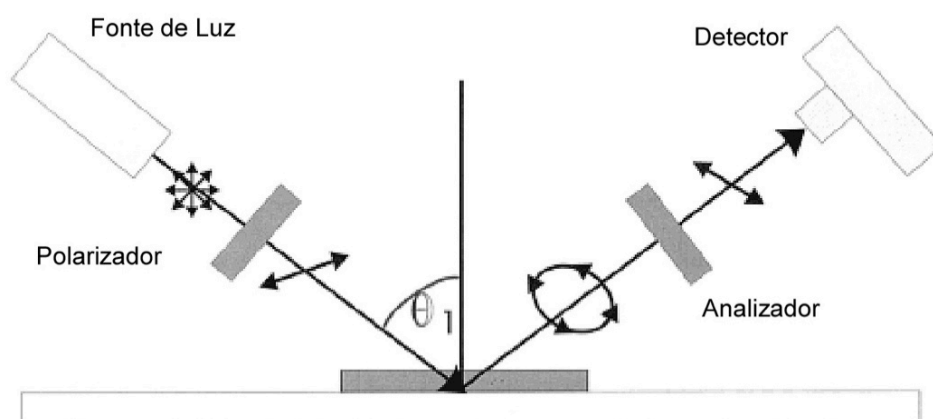


FIGURA 10 - ILUSTRAÇÃO DE UM MODELO DE ELIPSÔMETRO MOSTRANDO O ESTADO DA LUZ POLARIZADA SENDO REFLETIDA E PERCEBIDA PELO DETECTOR
 FONTE: OSTROFF *et al.* (1998)

As mudanças de fase (Δ) e de amplitude (ψ) da radiação após a reflexão são medidas com relação à radiação incidente. O Δ e ψ dependem do comprimento de onda da radiação (λ), do ângulo de incidência (Φ), da espessura (d) e do índice de refração (n) de um filme isotrópico e refletor, como mostra a equação fundamental da elipsometria (AZZAM, BASHARA, 1977) (eq. 1):

$$\tan \psi e^{i\Delta} = f(n, d, \Phi \text{ e } \lambda) \quad (1)$$

Através da equação 1, das relações de Drude e Fresnel, de cálculos iterativos e matrizes de Jones (AZZAM; BASHARA, 1977) pode-se obter os valores de n e d , independentemente. Quando as espessuras das camadas são muito finas ($\sim 1\text{nm}$) ou quando o contraste óptico não é suficiente para que d e n sejam obtidos independentemente um do outro, então, usa-se o índice de refração fixo a partir de dados da literatura ou do fabricante, e determina-se a espessura do filme (d_{poli}).

1.3.2 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) tem sido muito utilizada no estudo de polímeros por fornecer informações de topologias com resoluções atômicas, que não eram passíveis de se obter com o uso da microscopia eletrônica de varredura (BERNARDES FILHO; MATTOSO, 2003). O primeiro microscópio de tunelamento foi introduzido em 1986 por Binnig, Quate e Gerber (1986), o que lhes conferiu o prêmio Nobel em Física. O AFM é um instrumento que foi desenvolvido a partir dessa base do microscópio de tunelamento e resumidamente mede a superfície topográfica de uma amostra varrendo-a com uma sonda (USHIKI *et al.*, 1996).

A AFM está incluída em um vasto grupo de técnicas nomeadas como microscopias de varredura (SPM) compostas basicamente por três unidades componentes: microscópio, o controle e o computador (FIGURA 11).

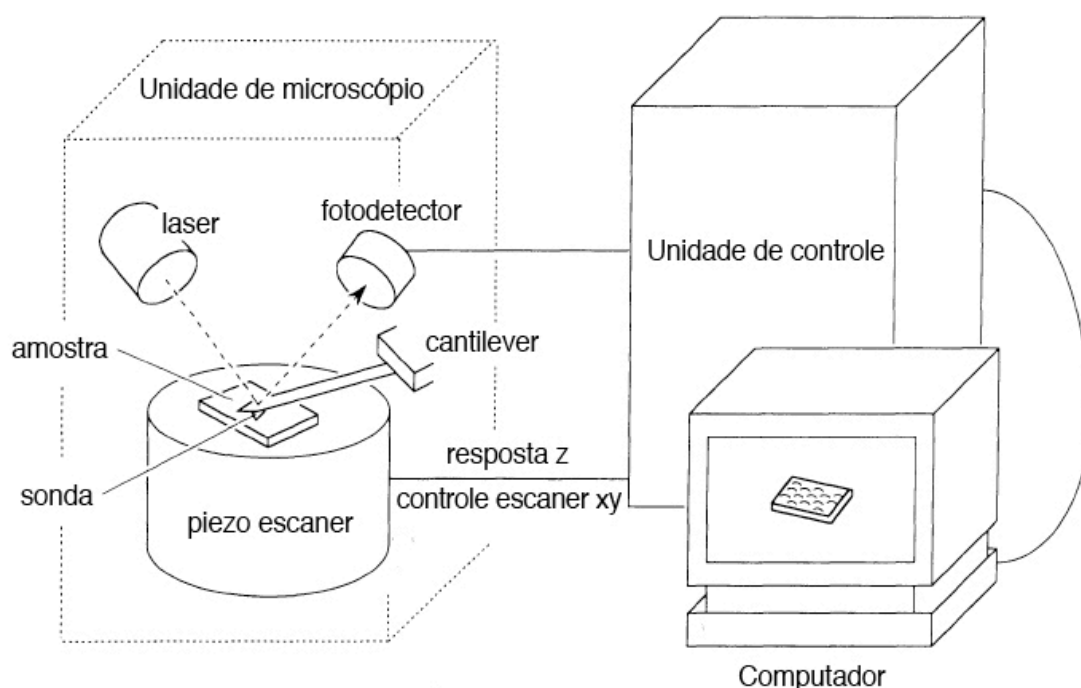


FIGURA 11 – ESTRUTURA BÁSICA DE UM MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA
FONTE: Adaptado de USHIKI *et al.* (1996)

A unidade composta pelo microscópio possui a sonda sensor ligada a um cantilever que oscila. A sonda aproxima-se da amostra e a escaneia através de linhas paralelas. Durante a varredura da amostra, podem atuar forças de atração e de repulsão, que variam em função da distância entre o cantilever e a amostra

(BERNARDES FILHO; MATTOSO, 2003), produzindo uma deformação elástica no cantilever. Através de circuitos de retroalimentação, esse deslocamento do cantilever é detectado pela deflecção do feixe de laser e convertido em imagens por um programa computacional desenvolvido especificamente para esse fim. Uma varredura xyz piezoeletrônica é usada para controlar a posição a ser escaneada na amostra (USHIKI *et al.*, 1996).

Existem três diferentes tipos de modos operacionais em AFM, modo contato, modo contato intermitente e modo não contato, que variam conforme o tipo de forças envolvidas na varredura (FIGURA 12).

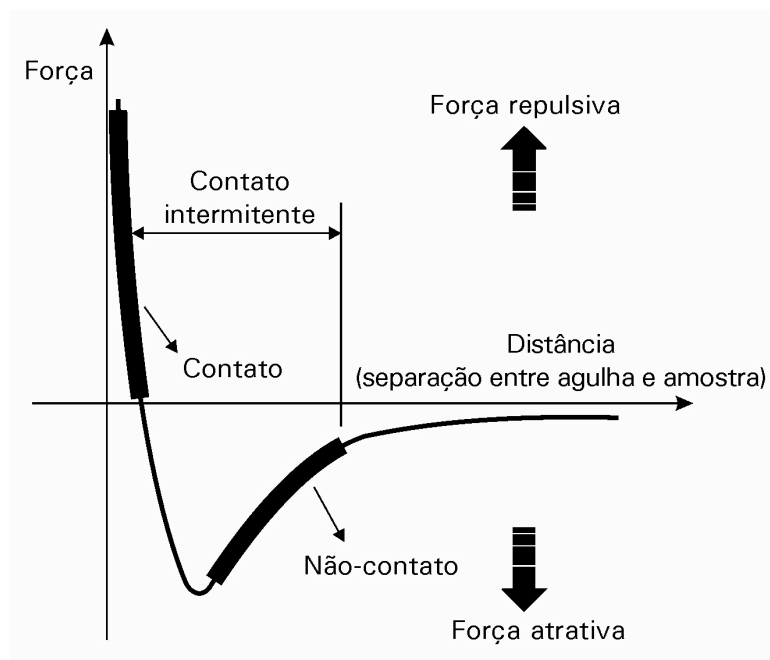


FIGURA 12 – MAPA DE FORÇAS ENTRE AMOSTRA E SONDA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA, CARACTERIZANDO OS DIFERENTES MODOS DE TRABALHO DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA

FONTE: BERNARDES FILHO; MATTOSO (2003)

No modo contato a distância entre a ponta e a amostra é mínima, e o aparelho é operado na região repulsiva em que as nuvens eletrônicas da amostra e da ponta começam a repelir-se. A sonda contendo a ponta é arrastada sobre a superfície, mantendo constante a força exercida pelo cantilever sobre a amostra.

No modo contato intermitente (*tapping mode*), a força sobre o cantilever oscila próxima à frequência de ressonância e o contato com a amostra é descontínuo. O cantilever, juntamente com a sonda, é colocada bem próxima à

amostra, até que o deslocamento contínuo e controlado do “scanner” piezo faça com que a sonda toque levemente a amostra. A amplitude de vibração do cantilever varia entre 20 e 100 nm, mas somente por um breve período do tempo total de vibração a sonda encosta na amostra.

O modo não contato baseia-se na separação entre a sonda e a amostra, em torno de 10 a 100 nm. O escaneamento está na região atrativa onde forças de longo alcance interagirão, tais como interações de Van der Waals, eletrostáticas, e forças de dipolo magnético. As imagens são obtidas através de oscilações do cantilever sem, tocar na superfície da amostra. As forças de interação são controladas por alterações na frequência de ressonância do cantilever (BINNIG; ROHRER, 1987).

O método escolhido para a varredura depende, entre outros fatores, da rigidez da amostra. O modo contato é o preferível quando se trabalha com amostras mais rígidas, e o modo contato intermitente é o método escolhido para amostras como polissacarídeos e macromoléculas biológicas flexíveis por ser menos destrutivo e fornecer informações suficientes sobre a superfície (WU *et al.*, 2009).

As duas imagens mais comuns são obtidas através dos modos de AFM contato ou contato intermitente. No modo contato, a quantidade da variação de z necessária para manter constante a força de interação é plotada versus as coordenadas x e y , produzindo então a chamada imagem de topografia. No modo contato intermitente o cantilever oscila, porém a amplitude dessa oscilação é mantida constante e a imagem é obtida ao plotar o deslocamento da amostra com relação à base do cantilever, necessário para manter constante a vibração da amplitude. O atraso de fase entre o circuito de condução e a vibração da ponta também é medido e usado para compor a imagem chamada de imagem de fase (LAL; RAMMACHANDRAN; ARNSDORF, 2010). As imagens finais produzidas apresentam as informações através de graduação de escala de cores.

Atualmente, a AFM tem sido uma das escolhas para obter informações com relação à topologia de amostras como biopolímeros. Imagens em alta resolução de, por exemplo, DNA (THUNDAT; ALLISON; WARMACK, 1994; YANG; TAKEYASU; SHAO, 1992; FRITZSCHE; SCHAPER; JOVIN, 1994), proteínas (MÖLLER *et al.*, 1999) e polissacarídeos (LUCYSZYN *et al.*, 2009; LUCYSZYN *et al.*; 2011; WU *et al.*, 2009) foram obtidas, visto que essa técnica permite a visualização de materiais não condutores, e ainda, sem destruir ou provocar danos irreversíveis na amostra.

1.3.3 Microbalança de cristal de quartzo

A microbalança de Cristal de Quartzo (ou QCM, do inglês: Quartz Crystal Microbalance) é uma técnica capaz de medir sensivelmente alterações de massas por unidades de área, através de variações na frequência de um cristal de quartzo ressonador. A ressonância é perturbada pela adição ou a remoção de pequenas quantidades de massa de um filme em crescimento sobre uma superfície de um ressonador acústico. Sendo assim, a QCM-D é usada para caracterizar interfaces de filmes formados. Pode ser usada para avaliar adsorção de proteínas, polímeros, lipídeos e até mesmo células.

O princípio do QCM está relacionado com o efeito piezoelétrico, no qual certos materiais possuem a propriedade de gerar um campo elétrico quando são submetidos a deformações ou pressões externas. Variando a pressão mecânica, varia-se também a polaridade do campo elétrico gerado. Esse fenômeno é denominado efeito piezoelétrico direto. Quando há uma deformação mecânica através de uma variação no campo elétrico, tem-se o efeito piezoelétrico indireto. Os cristais que exibem esse efeito são chamados cristais piezoelétricos (VARELA; ALTA; TORRESI, 2000). Quando a perturbação elétrica tem as características adequadas (amplitude e frequência), o cristal oscilará mecanicamente em um modo ressonante (LU; CZANDERMA, 1984).

Portanto, a QCM é uma técnica eletrogravimétrica utilizada para o acompanhamento das mudanças ocorridas na superfície de um transdutor piezoelétrico, após imobilização de um material (WATANABE, 2006), monitorando a frequência de oscilação do cristal de quartzo em função de uma massa aderida (rígida ou viscosa).

A frequência de oscilação do cristal de quartzo é dependente da espessura do cristal. Durante uma operação normal, uma mudança na espessura correlaciona diretamente uma mudança na frequência. Uma massa depositada na superfície do cristal aumenta a espessura, conseqüentemente a frequência de oscilação diminui do valor inicial. A mudança na frequência pode ser quantificada e correlacionada através de uma equação matemática, descrita pioneiramente por Sauerbrey (1959) que propôs um modelo da proporcionalidade entre mudança na massa em um eletrodo oscilador de quartzo, em vácuo, e as associadas às mudanças na

frequência, através da seguinte EQUAÇÃO 1:

$$\Delta f = - \left(\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_c \rho_c}} \right) \Delta m = -K\Delta m \quad (2)$$

onde Δf é a variação da frequência de ressonância em Hz, A é a área geométrica piezoelectricamente ativa em cm^2 , f_0 é a frequência fundamental do cristal, Δm é a variação da massa, μ é o modo de cisalhamento do quartzo e ρ é a densidade de massa do quartzo.

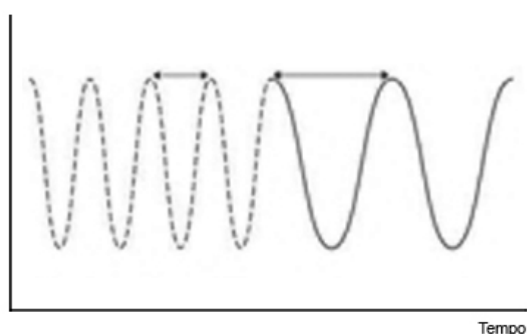
No entanto, foi a partir da década de 80 que o uso do QCM começou a expandir-se com a aplicabilidade de QCM em meio líquido demonstrada por Nomura e Minemura (1980). O inconveniente foi que com a utilização de meios líquidos, a viscosidade e a elasticidade das amostras contribuiriam para a mudança na frequência, e violaram a equação de Sauerbrey que era usada apenas para meios rígidos. Isso levou a novas abordagens para caracterizar a massa depositada com perdas dissipativas devido ao caráter viscoelástico (DIXON, 2008).

Por isso, em equipamentos de QCM mais modernos, além da variação da frequência acompanha-se também a dissipação do cristal após a excitação. Essa tecnologia é chamada de QCM-D, em que através do fator de dissipação obtém-se informações com relação a mudanças de conformação, rigidez e viscoelasticidade das moléculas usadas. A dissipação é a soma de todas as energias perdidas no sistema por ciclo de oscilação. Um filme flexível que adsorve sobre o cristal de quartzo é deformado durante a oscilação, o que fornece um alto valor de dissipação. Um material rígido, no entanto, irá fornecer baixos valores de dissipação (Q-SENSE, 2011). Quando um filme adsorve sobre o cristal, pode-se estar também adsorvendo uma quantidade de água, que varia muito para cada tipo de molécula. Através da dissipação, é possível determinar se o filme formado é flexível, com alto teor de água, ou mais rígido, com baixo teor de água.

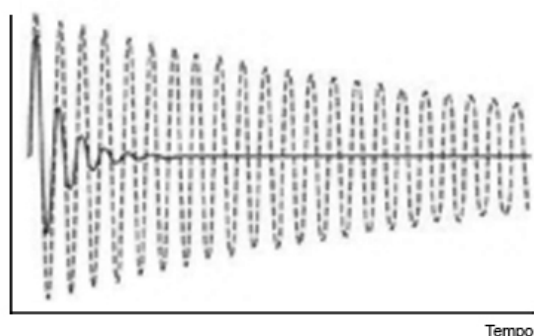
A FIGURA 13 representa esquematicamente a formação de filmes finos acompanhados por QCM-D. Um sensor inicialmente oscila em uma frequência específica, a uma determinada voltagem aplicada. A frequência de oscilação diminui

no momento em que uma massa é adsorvida. Retirando a voltagem, há um decaimento na oscilação, essa taxa de decaimento, ou o fator de dissipação estará relacionado com elasticidade ou viscosidade da camada formada. A FIGURA 14 ilustra como são obtidos os dados em uma análise de QCM.

(A) FREQUÊNCIA



(B) DISSIPACÃO



(C)

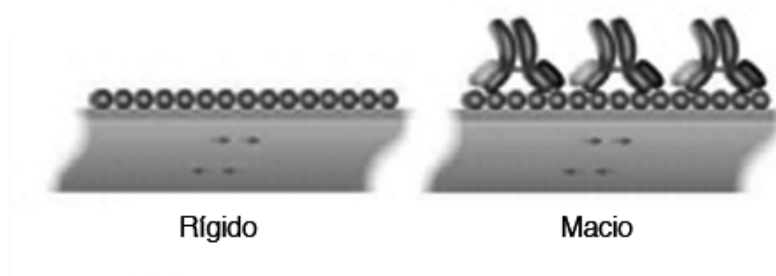


FIGURA 13 – DESENHO ESQUEMÁTICO SOBRE A TÉCNICA DE QCM-D. AS ALTERAÇÕES COM O AUMENTO DA MASSA DEPOSITADA (C) ESTÃO REPRESENTADAS PARA FREQUÊNCIA (A), ONDE (---) É A MASSA INICIAL E (—) É A MASSA ACRESCIDA; E (B) DISSIPACÃO, ONDE (---) É UM COMPOSTO VISCOELÁSTICO E (—) UM COMPOSTO RÍGIDO

FONTE: Adaptado de Q-SENSE (2011)

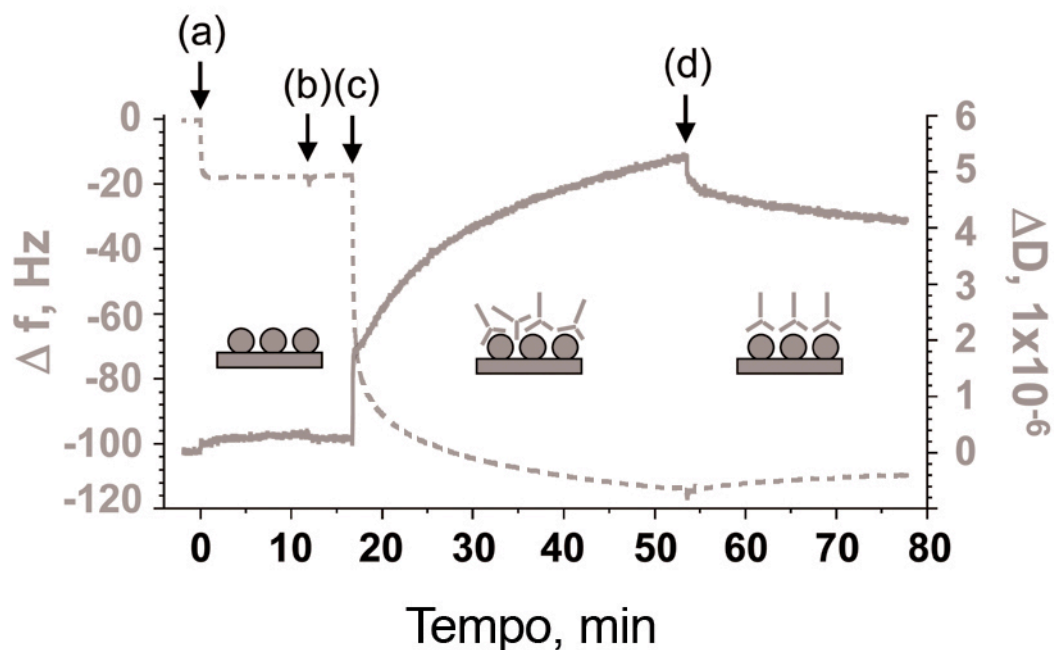


FIGURA 14 – EXEMPLIFICAÇÃO DE ADSORÇÃO OBTIDA, ATRAVÉS DA TÉCNICA QCM-D, DE SORO ALBUMINA HUMANA (A) E SEU RESPECTIVO ANTICORPO (C). OS PASSOS (B) E (D) CORRESPONDEM AOS PROCESSOS DE LAVAGEM COM SOLUÇÃO TAMPÃO. FREQUÊNCIA EM LINHA PONTILHADA; DISSIPAÇÃO EM LINHA CHEIA
 FONTE: Adaptado de KANAZAWA (1985); DIXON (2008)

Nesse exemplo, está adsorvendo a soro albumina humana (a) e o seu respectivo anticorpo (c). Os passos (b) e (d) correspondem ao processo de lavagem com solução tampão. As mudanças na frequência (Δf) estão representadas no eixo esquerdo do gráfico, enquanto que variações na dissipação (ΔD) estão representadas no eixo direito do gráfico. Observa-se que na etapa (a) há uma mudança na frequência, porém, sem alterações nos valores de dissipação, indicando que a soro albumina humana apresenta um filme com características rígidas quando adsorve sobre a superfície. Já, na adsorção do anticorpo, etapa (c) há um grande aumento tanto na dissipação quanto na frequência, indicando que ambas as massas adsorveram e houve um aumento na característica viscoelástica devido à incorporação de água no sistema. Além disso, a etapa de lavagem (d) mostra como uma alteração conformacional do anticorpo pode ser detectada, bem como as moléculas não adsorvidas que serão carregadas para fora do sistema (KANAZAWA; GORDON, 1985; DIXON, 2008).

Atualmente, vários são os estudos que utilizam a tecnologia do QCM

principalmente na área biológica. Desenvolvimento de superfícies contendo DNA para ser utilizada como matriz (RAWLE *et al.*, 2007), monitorar em tempo real o DNA genômico de mamíferos (RAWLE *et al.*, 2008), ou criar biossensores para detecção de organismos geneticamente modificados (KARAMOLLAOĞLU, ÖKTEM; MUTLU, 2008). Adsorção de proteínas para a criação de biossensores (CHEN *et al.*, 2010); proteínas que possam promover a adesão celular (ATTHOFF; HILBORN, 2007) ou servir de base para revestimentos de biomateriais (FEILER *et al.*, 2007). Lipídeos também são alvos de estudos, como na adsorção de bicamadas lipídicas para fornecer maiores informações sobre membranas celulares (WIKSTRÖM *et al.*, 2008), ou para estudo da tecnologia de superfícies (CHO *et al.*, 2007). Ou ainda, adsorção de células para compreensão das características e os mecanismos de adesão celular (WITTMER *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007a).

No campo de nanofilmes formados por multicamadas contendo polissacarídeos, o uso de QCM é amplo. Filmes de hialuronana (SCHNEIDER *et al.*, 2007); quitosana / hialuronana (RICHERT *et al.*, 2004c); ácido hialurônico / poli-L-lisina (BALL *et al.*, 2005) são exemplos de estruturas estudadas fornecendo base e informações relevantes de como as cadeias poliméricas comportam-se durante a formação de filmes multicamadas, os quais poderão servir de base para a adesão celular ou o recobrimento de materiais.

1.3.4 Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica, não destrutiva, que mede a absorbância diferencial entre as rotações de luz esquerda e direita (FIGURA 15), quando um feixe de luz circularmente polarizada incide sobre uma amostra.

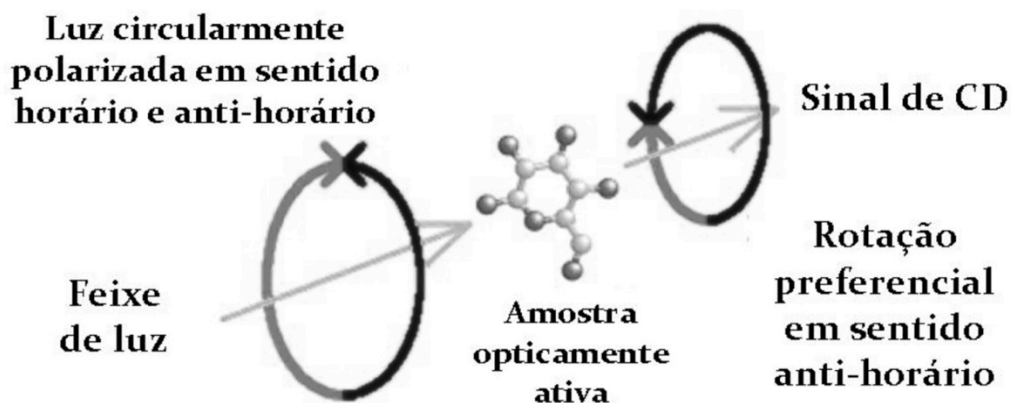


FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETECÇÃO POR DICROISMO CIRCULAR DA GLUCOSE, UM AÇÚCAR SIMPLES
 FONTE: ISA (2007)

Esse fenômeno é medido em bandas de absorção em função de um comprimento de onda. Para que esse método seja válido é necessário que a amostra seja opticamente ativa, isso é, tenha centros quirais (VENYAMINOV; YAND,1996).

A luz é dita circularmente polarizada quando duas ondas, elétrica e magnética, de mesma amplitude e frequência são sobrepostas, porém apresentam um deslocamento de $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda uma em relação à outra, resultando em um vetor do campo elétrico que gira em torno de um círculo, tanto em sentido horário quanto anti-horário. Quando a amplitude das duas ondas não é exatamente igual, o vetor do campo elétrico gira em sentido horário e anti-horário em uma elipse, obtendo-se então uma luz elipticamente polarizada (AUTSCHBACH, 2011).

A maior parte das moléculas biológicas são quirais, como as proteínas, os polinucleotídeos e os carboidratos, o que explica o uso dessa técnica para detectar mudanças conformacionais de macromoléculas, composição de mistura quirais, interações entre moléculas (VENYAMINOV; YAND,1996). Uma formação de complexo geralmente é associada com a mudança na estrutura secundária, que pode ser acompanhada por CD.

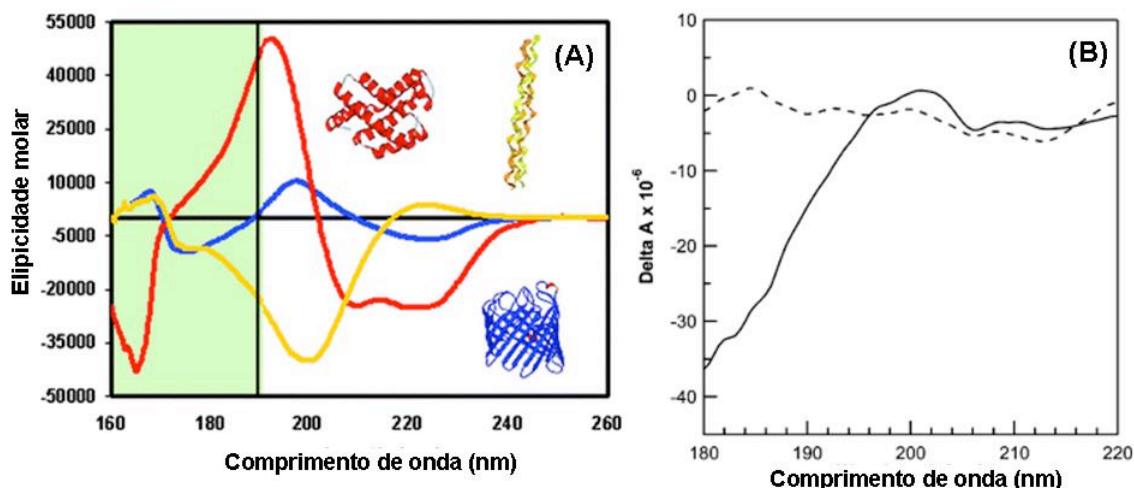


FIGURA 16 - (A) ESPECTRO DE DICROÍSMO DE ESTRUTURAS α -HÉLICE (VERMELHO), FOLHA β (AZUL) E HÉLICE TIPO POLIPROLINA (AMARELO). (B) ESPECTRO DE DICROÍSMO DE CARRAGENANAS (3 g/L, EM KCl 0,01M, pH 7): λ - (LINHA PONTILHADA) QUE TEM CONFORMAÇÃO AO ACASO E κ - (LINHA CONTÍNUA) QUE TEM ESTRUTURA HELICOIDAL, À 25°C
 FONTE: Adaptado de A – MILES; WALLACE (2006); B - SCHOELER *et al.* (2006)

O perfil do espectro de CD (FIGURA 16) depende da estrutura secundária, e determina proporções de α -hélices, estruturas β , $\beta + \alpha$, α/β e estruturas aleatórias ou ao acaso (*random coil*) (BRAHMS; BRAHMS, 1980), no caso de proteínas; ou no caso de carboidratos estruturas do tipo hélice, como a amilose que apresenta cadeia helicoidal, ou a celulose que é similar às estruturas β , pois suas cadeias organizam-se paralelamente como “folhas” ou camadas.

Alguns estudos foram feitos usando a técnica de CD para galactomanana extraída de sementes. DENTINI *et al.* (2006) acompanharam a cinética de reação de epimerização com galactomanana modificada de alfarroba e a interação dessa com íons cálcio; estudos envolvendo a interação de galactomanana de alfarroba com uma xantana desacetilada (GOYCOOLEA; MILAS; RINAUDO, 2001); e galactomanana de *Schizolobium parahybae* com xantana (BRESOLIN *et al.*, 1998).

1.3.5 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X

A espectroscopia Fotoeletrônica de raios-X, XPS (em inglês, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*), também chamada de espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA); é uma técnica de análise físico-química que fornece a análise elementar e a informação sobre ligações químicas de uma determinada superfície.

O efeito fotoelétrico é o princípio básico das análises por XPS (SEAH; DENCH, 1979). Nessa técnica, incide-se um feixe de raios-X de alta energia sobre a amostra em um ambiente de alto vácuo, promovendo a emissão de elétrons dos orbitais mais internos. A energia cinética dos elétrons que são ejetados das primeiras monocamadas é determinada pela diferença entre o valor da energia da radiação incidente e a energia de ligação do elétron (BRIGGS; SEAH, 1996). Como a energia dos fotoelétrons é característica para cada átomo da tabela periódica, o XPS consegue medir a composição elementar atômica relativa da amostra (SAAD *et al.*, 2011; FÄLDT; BERGENSTAHL; CARLSON, 1993).

A técnica de espectroscopia XPS fornece informações da superfície em camadas de aproximadamente 5-10 nm (FÄLDT; BERGENSTAHL; CARLSON, 1993). Como possui esse limite de detecção, a caracterização por XPS tem tido um crescimento importante nas últimas décadas, principalmente em campos de biomateriais (CASTNER; RATNER, 2002), DNA (HERNE; TARLOV, 1997), proteínas (COEN *et al.* 2001), peptídeos (COOK *et al.* 1997), carboidratos (LEONARD *et al.* 2001; LUBAMBO *et al.* 2009; NEP; CONWAY, 2011) e, na nanotecnologia, como no caso de análise de superfície de filmes ultrafinos.

A análise elementar de componentes biológicos normalmente é definida considerando principalmente três elementos químicos mais comuns: carbono, nitrogênio e oxigênio (GAIANI *et al.*, 2006; NIJDAM; LANGRISH, 2006; SAAD, 2011). Portanto, procura-se os picos de C_{1s}, N_{1s} e O_{1s} nas análises de XPS, que podem ser decompostos em energias específicas de ligação. A área desses picos característicos é uma medida da abundância relativa do elemento respectivo, enquanto que a forma e a posição dos picos refletem o estado químico de cada elemento.

De acordo com a revisão e conhecimentos acima descritos, o trabalho apresentado nesta tese teve como proposta avaliar a formação de nanofilmes, utilizando a mistura de alginato de sódio e galactomanana, os quais são uma inovação em relação à ausência de publicações e que, em razão de suas características, podem servir também de base em futuras aplicações, como por exemplo, na fabricação de biosensores que poderiam ser utilizados na biomedicina em testes de diagnósticos de algumas doenças.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanofilmes a partir da galactomanana de sementes de leucena e da mistura de a galactomanana e o alginato, e avaliar aplicações biológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (GML);
- Analisar as características físico-químicas da GML e do alginato (AL) quanto à composição, homogeneidade, dispersão, agregação, massa molecular, tamanho, conformação e estrutura;
- Investigar o comportamento reológico de soluções das misturas GML-AL em presença ou não de íons cálcio em diferentes pHs (4,2, 7,2 e 11,2);
- Caracterizar por potencial zeta as soluções aquosas dos polieletrólitos em pH 6,7;
- Caracterizar através de dicroísmo circular e da microscopia de fluorescência a mistura formada por GML-AL;
- Analisar a citotoxicidade da GML e do AL;
- Desenvolver nanofilmes de GML em monocamadas;
- Desenvolver nanofilmes, com a presença da mistura GLM-AL, em multicamadas;
- Acompanhar por elipsometria e/ou QCM-D ou XPS crescimento desses filmes;
- Analisar por microscopia de força atômica a morfologia e a rugosidade dos filmes formados;
- Testar os nanofilmes em possíveis aplicações biológicas através da adsorção de proteínas (albumina, concanavalina A), partícula viral (vírus da dengue) ou crescimento de células (HeLa).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FONTE DE AMOSTRAS UTILIZADAS

A galactomanana foi extraída a partir de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena), coletadas no *campus* Centro Politécnico da UFPR, em Curitiba, onde um “voucher” (exsicata) da espécie encontra-se no Herbarium UPCB (Departamento de Botânica/UFPR), sob o número 14028. A metodologia empregada no processo de extração foi a mesma descrita por Valenga (2007).

O alginato na forma de sal de sódio (AL) foi adquirido comercialmente da Proquimios, Rio de Janeiro / Brasil.

A albumina bovina (ALB) foi adquirida da Sigma/Aldrich® com o código A3803, e uma massa molar especificada de aproximadamente 66.000 g/mol.

A Concanavalina A (ConA), tipo IV, de *Concanavalina ensiformis* foi adquirida comercialmente da Sigma/Aldrich®, com massa molar especificada de aproximadamente 25.583 g/mol, e com ponto isoelétrico entre 4,5-5,6.

Os vírus da dengue foram cedidos pelo prof. Dr. Benedito A. L. Fonseca, do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, à Prof. Dr. Denise F. S. Petri colaboradora deste trabalho.

As células de fibroblasto (L929) foram adquiridas do banco de células da UFRJ (BCRJ), e eram culturas secundárias extraídas do tecido conectivo de adipócitos de camundongos (*Mus musculus* C3H/NA) machos com 100 dias de vida (BCRJ CR020/ATCC CCL1). As culturas foram mantidas em meio MEM (Gibco-BRL) suplementado com 10% soro fetal bovino (Sigma/Aldrich®), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Roche) e 12 mM/L de L-glutamina (Ajinomotto) e 1% de aminoácidos não-essenciais, e conservadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, e com pH do meio em 7,4.

As células HeLa foram obtidas do Banco Europeu de Células e foram mantidas em meio DMEM (Gibco-BRL) suplementado com 10% soro fetal bovino (Sigma/Aldrich®), 100 IU/mL de penicilina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Os outros biopolímeros tais como a quitosana (CHI), o polipeptídeo poli-L-lisina (PLL) e o polímero poli(alilamina hidrocloreto) (PAH) foram adquiridos

comercialmente da Sigma/Aldrich[®]. A quitosana utilizada foi a de média massa molar (190.000 – 310.000 g/mol), com 75-85% de grau de desacetilação; a poli-L-lisina estava na forma de hidrobrometo, e o hidrocloreto de poliamina possuía massa molar de 15.000 g/mol.

3.2 PURIFICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE LEUCENA

Para purificar a galactomana (GM), extraída e deslipidificada em trabalhos anteriores por Valenga (2007), o polissacarídeo foi ressuspenso em água em uma concentração de 1 mg/mL. O material foi centrifugado (Centrífuga 4K15C, Sigma) por 20 minutos a 9.979,2 g, a 20°C; o sobrenadante foi filtrado por membrana de acetato celulose com poros de 3 e 0,8 µm, respectivamente. A solução resultante foi concentrada, precipitada com 2 volumes de etanol e seca com acetona a 25°C. Após a purificação a amostra passou a ser denominada de GML.

3.3 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO – QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS

3.3.1 Determinação da composição monossacarídica da galactomanana purificada

Para essa análise foi feita, primeiramente a hidrólise da galactomanana com H₂SO₄ a 72%, durante 1h a 4°C. Em seguida, o ácido foi diluído para 8% e o sistema aquecido por 4h, a 96°C. Para a neutralização foi adicionado carbonato de bário e o material foi filtrado para a remoção de sal (SAEMAN *et al.*, 1954). Em seguida, foi feita a redução com boroidreto de sódio, por 16h. As amostras foram tratadas com resina LEWATIT – S – 100 (H⁺) e filtradas. As soluções obtidas foram evaporadas e lavadas várias vezes com metanol até a secura. Os alditóis foram acetilados com anidrido acético e piridina (v/v), por 12h. A reação foi interrompida pela adição de gelo moído, os acetatos de alditol foram extraídos com clorofórmio, lavados várias vezes com solução aquosa de CuSO₄ (5%), evaporados e redissolvidos em clorofórmio para a análise por cromatografia gasosa, CG (SAWADEKER; SLONEKER; JEANES; 1965).

3.3.2 Análise elementar de galactomanana purificada

A análise de CHN para a amostra foi feita em analisador elementar modelo 2400 CHN (Perkin Elmer), pela Central Analítica – IQ/USP. Para isso, foi usado 10 mg do material seco e na forma de pó.

3.3.3 Análise por ressonância magnética nuclear de próton do alginato

A análise da composição do alginato de sódio foi feita por RMN de próton (^1H) em equipamento da marca BRUKER, modelo DRX-400, série AVANCE, em tubo de 5 mm de diâmetro, em água deuterada (D_2O , 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories Inc.) a 70°C . Os deslocamentos químicos de ^1H (δ 2,224 ppm) foram baseados no da acetona, utilizada como padrão interno.

Primeiramente, promoveu-se a troca de hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção das moléculas de água presente através da solubilização das amostras em D_2O , congelamento e liofilização. Esse processo foi repetido, no mínimo, 3 vezes.

Os espectros de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, janela espectral de 8250,8 Hz, com intervalo de aquisição de 4 s, intervalo entre os pulsos de 1 s, com no mínimo 16 aquisições, e com espectro de resolução de 16 K.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* que acompanha o equipamento ou MestReC versão 4.1.1.0. Esses experimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

3.3.4 Análise por GPC acoplado a multidetectores (RI, LALS, RALS, Viscosimétrico e UV) da galactomanana purificada, do alginato e da quitosana

Essas análises foram feitas para a determinação da massa molar ponderal média (M_w), raio de giração (R_g), raio hidrodinâmico (R_h), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e constante de Mark-Houwink (α). O dn/dc de ambos polissacarídeos foi determinado usando um refratômetro da Viscotek, modelo VE3580, com 5 concentrações entre 0,1 a 1,0 mg/mL, em soluções de nitrato de sódio 0,1 M, contendo azida de sódio 200 ppm, obtidas por agitação das amostras por 14h, a

25°C e filtração por membranas Millipore, 0,45 µm. O índice de refração de cada concentração forneceu a constante dn/dc que foi usada para calcular a massa molar de cada amostra.

Para as análises no GPC (do inglês *Gel Permeation Chromatography*) também conhecida por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*) foram injetados 100 µL das soluções a 1mg/mL de polissacarídeos isolados, ou da mistura GML-ALB (5% de ALB). Para tal, as amostras de galactomanana e alginato foram solubilizadas em nitrato de sódio 0,5 g/L contendo azida de sódio 200 ppm; e da quitosana em tampão acetato, agitadas por 14h, a 25°C, e filtradas por membrana Millipore de 0,22 µm. O cromatógrafo continha colunas de polimetacrilato PWxl (Tosoh, Japão) 6000, 4000 e 2500 conectadas em série e com limites de exclusão de 8×10^6 , 3×10^5 e 3×10^3 Da, respectivamente. Durante a eluição, as colunas foram mantidas em forno a 30°C, e estavam acopladas ao refratômetro diferencial da Viscotek, modelo VE3580, a um detector de espalhamento de luz laser, modelo 270 Dual Detector (Viscotek), constituído por baixo ângulo, a 7° (LALLS, do inglês *Low Angle Laser Light Scattering*), e ângulo reto, a 90° (RALLS, do inglês *Right Angle Laser Light Scattering*), com λ a 632,8 nm. E, também, a um detector viscosimétrico, ou ainda a um detector de ultra violeta (UV). Como eluente foi utilizado o mesmo solvente usado para solubilizar as amostras, com fluxo controlado em 0,8 mL/min. Utilizaram-se padrões de óxido de polietileno (PEO, 22.000 g/mol) e dextrana (70.000 g/mol) recém-preparados em água, ambos fornecidos pela Viscotek para confirmar a calibração do equipamento.

Todos os parâmetros possíveis de serem calculados por essas análises raio de giração, R_g ; raio hidrodinâmico, R_h , viscosidade intrínseca, $[\eta]$ constante de Mark-Houwink, (α) foram obtidos através do *software* OmniSec.

3.3.5 Análises reológicas das misturas galactomanana purificada-alginato

As análises reológicas das soluções de polissacarídeos foram realizadas em triplicata, em pHs 4,0; 7,2 e 11,2. Para as medidas das misturas as amostras de galactomanana e alginato foram dispersas conjuntamente em água, sob agitação, por 16 horas. A concentração de 15 mg/mL, em uma proporção de 50% (m/m) de

cada polissacarídeo, foi utilizada com bases nos resultados obtidos por Valenga (2007), assim como a concentração de 45 mMol/L da solução de CaCl₂. As análises dos sistemas foram feitas em reômetro HAAKE modelo Rheostress 1, com sensor pp35, acoplado a um microcomputador com software “Haake rheometer”. A temperatura das análises de 25°C foi controlada através de um banho termo circulante Haake (DC30) e um dispositivo de termostatização UTC.

3.3.6 Análise por espectroscopia de fluorescência utilizando sonda de pireno das soluções de galactomanana purificada e de alginato

Para determinar o efeito da agregação e a concentração crítica, fez-se uma curva de concentração (2 mg/mL – 0,04 mg/mL) ao solubilizar os polímeros em água purificada. À cada concentração foi adicionado 0,005 mL de uma solução de pireno/metano (1,2 mg de pireno / 5 mL de metanol). A leitura de fluorescência, realizada para 3 amostras preparadas em triplicata, foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência HITACHI – F4500 (Departamento de Química, UFPR) em cubeta de vidro, com varredura de 360 nm até 500 nm. A relação da intensidade do pico III pelo pico I mostra o efeito de agregação e/ou encapsulamento da sonda e, também, pode determinar a concentração micelar crítica ou a concentração de agregação crítica (para polissacarídeos) (DUALEH; STEINER, 1990; KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977).

3.3.7 Dicroísmo circular da solução de galactomanana, de alginato e das misturas galactomanana-alginato e galactomanana-alginato-albumina

Os experimentos de dicroísmo circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) foram realizados na faixa de 250-190 nm, em espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Instruments, Tokyo, Japão) com 16 médias de varreduras, utilizando cubeta de quartzo retangular de 1 mm de caminho óptico. As amostras, preparadas em triplicata de GML, AL, mistura GML-AL (1 mg/mL) e da mistura GML-AL contendo 0,5 mg/mL de ALB foram solubilizadas em água purificada (FERRALI *et al.*, 1997; CICCOLI *et al.*, 1994) e analisadas a 25°C usando banho termocirculante modelo TC-100 (Jasco) em modo contínuo. O espectro de CD foi obtido em miligraus

(CAMPANA *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 1998) e utilizou-se o *software* Origin 7.5 para o tratamento dos dados. Os ensaios foram efetuados no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Carlos (IF-USP/SC), sob a colaboração e orientação da Prof. Dra. Leila M. Beltramini.

3.3.8 Obtenção de derivados de galactomanana purificada, de albumina e de alginato marcados por sondas fluorescentes e análises por microscopia de fluorescência

A marcação da GML foi feita segundo o trabalho de Goff; Ferdinando e Schorsch (1999) que utilizaram as galactomananas de alfarroba e de goma guar. O método de Belder e Granath (1973) modificado foi feito ao solubilizar 1g de GML em 10 mL de DMSO, contendo algumas gotas de piridina. Foi adicionado então, 0,1 g de rodamina B isotiocianato (RO), seguido de 20 mg de dilaurato dibutilina (como catalisador). Essa solução foi aquecida e agitada por 2h a 95°C. O polissacarídeo foi precipitado com 4-5 volumes de etanol, filtrado e lavado várias vezes até que mais nenhuma coloração fosse observada no etanol da lavagem. O precipitado denominado de GML-RO foi seco e o rendimento final obtido foi de 83%.

A marcação do AL foi feita baseada no trabalho de Ahmed *et al.* (2004) e de Srivastava *et al.* (2009), onde 100 mg de alginato foram dissolvidos em 3,5 mL de água. Então, foi adicionada a solução de 6,7 mg de NHS (éster de biotina-N-hidroxissuccinato) dissolvido em 0,300 mL de dimetil-formamida (DMF), seguido de 11,66 mg de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). Depois de 90 minutos, 1,45 mg de aminofluoresceína (AF) em 0,58 mL de tetrahidrofurano (THF) foi adicionado gota a gota. A reação foi deixada para ocorrer durante a noite. O produto final foi precipitado com acetona e lavado mais uma vez com acetona, seco e o rendimento final do derivado denominado de AL-FL de 55%.

A marcação da ALB foi feita como descrito no trabalho de Zhang *et al.* (2010) em que uma solução foi preparada a 25 mg/mL em 0,1 M de solução tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,7, à qual foi acrescentado 0,6 mg de fluoresceína isotiocianato (Fluka). Essa mistura foi agitada por 4h no escuro, em seguida foi centrifugada com tubos “Centrifugal Filter Tube, Millipore” por 15 minutos, 25°C. A

solução de albumina marcada (ALB-FL) foi lavada, várias vezes, com solução tampão até se obter um sobrenadante límpido.

As análises das soluções ou de filmes foram feitas para duas amostras, no Departamento de Farmacologia da UFPR, em microscópio de fluorescência modelo Olympus BX51WIF (Alemanha), em um aumento de 400x, com emissão de fluorescência X-cite Series 120Q. As imagens foram adquiridas por uma câmera Olympus DP72 e digitalizadas pelo programa de computador para imagens de fluorescência, Cell F - Olympus.

3.3.9 Determinação do potencial zeta dos polímeros

O potencial zeta das soluções dos polímeros, utilizados para obtenção de filmes multicamadas, foi medido para quatro amostras de cada solução, usando o equipamento Malvern Zetasizer 3000 HS do Institut Charles Sadron, Estrasburgo, França. Um laser foi usado como fonte de luz, iluminando as partículas dentro da amostra, incidindo na célula e sendo espalhado pelas partículas. O espalhamento no ângulo de 17° foi detectado. Quando um campo elétrico foi aplicado na célula de análise, as partículas afetaram a quantidade de luz espalhada, e esse espalhamento foi detectado e convertido a um valor numérico. Para essas análises, soluções dos polímeros foram preparadas nas mesmas concentrações que foram usadas para crescer o filme multicamadas. Essas soluções foram colocadas em cubetas capilares de poliestireno e lidas no equipamento.

3.4 ENSAIO BIOQUÍMICO CELULAR

3.4.1 Análise de citotoxicidade da galactomanana purificada e do alginato

As análises foram realizadas no NIQFAR, UNIVALI, Itajaí, SC, com a colaboração e orientação do Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas. Para isso, as amostras de GML e AL foram solubilizadas em água, com duas concentrações: 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL.

A citotoxicidade nas células foi determinada pelo teste MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo) (Sigma/Aldrich®). As células L929

foram plaqueadas, em placas de 96 poços, a 2.10^4 células/poço e incubadas com 300 μ L de meio MEM suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), por 24h, a 37°C, em 5% CO₂. A fim de manter todas as células em um mesmo estágio da divisão celular (Go), o meio MEM com SFB foi substituído por 180 μ L de meio MEM sem SFB e incubado por 24h, a 37°C, em 5% CO₂. Posteriormente, foram adicionados 20 μ L das substâncias testes (GML e AL) com concentração de 0,5 e 1 mg/mL, do controle positivo dimetilsulfóxido (DMSO) e do controle negativo (PBS), e incubadas por 1 e 24h, a 37°C, em 5% CO₂. Após esse tempo foi retirado o meio e foi adicionado 270 μ L de MEM sem SFB e 30 μ L de MTT (5 mg/mL, preparado em meio MEM sem SFB), e as placas foram incubadas por 4h, a 37°C, em 5% CO₂. O meio juntamente com o MTT foi retirado e os cristais de formazan insolúveis foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO. A determinação da absorbância foi realizada em leitor de microplaca a 570 nm. A viabilidade relativa das células relacionadas ao controle sem as substância testes foi calculada como absorbância da amostra teste/absorbância do controle negativo x 100 (MOSMANN, 1983), e expressa pela média e desvio padrão.

3.5 FORMAÇÃO E ANÁLISES DOS FILMES

Esses experimentos foram feitos no IQ/USP-SP colaboração e orientação da Prof. Dr. Denise F.S. Petri, ou no Instituto Charles Sadron, Strasburg-FR sob a colaboração e orientação do Prof. Dr. Gero Decher.

3.5.1 Preparo das lâminas de silício amino-funcionalizadas ou não

Lâminas de silício (Si) do tipo (111) recobertas com uma camada de SiO₂ nativo foram fornecidas pela SiliconQuest (EUA), e para a silanização foi utilizado o 3-aminopropiltrimetoxisilano (APS) fornecido pela Fluka (Basel, Suíça).

As superfícies, cortadas em tamanhos de aproximadamente 1,5 x 1,5 cm², foram amino-funcionalizadas a partir da reação de silanização das lâminas de Si com APS (PETRI *et al.*, 1999). Primeiramente, as lâminas de silício foram limpas imergindo-as em uma mistura oxidativa contendo H₂O₂, NH₃ e H₂O, na proporção de 1:1:4 (v/v), a 75°C, durante 20 minutos. Depois desse período as lâminas foram

retiradas da mistura, lavadas em água destilada e secas com jatos de nitrogênio. Após serem limpas foram mergulhadas em uma solução de APS em tolueno (1%, v/v) a 60°C durante 20 segundos, sendo lavadas, em seguida, em tolueno puro e secas com jatos de nitrogênio. Através desse método obteve-se uma monocamada amino-funcionalizada homogênea (PETRI *et al.*, 1999) ligada covalentemente à lâmina de silício.

Para as lâminas de silício que foram usadas sem a silanização, o procedimento de lavagem foi mais simples. Primeiramente, as lâminas foram mergulhadas em solução de acetona P.A. Então foram colocadas por uma hora em solução de metanol:ácido clorídrico (1:1, v/v). Após o enxague com água em abundância, as lâminas foram mergulhadas por no mínimo uma hora em solução de ácido sulfúrico e foram deixadas nesse banho ácido até o momento da utilização. Antes de usá-las foram lavadas com água e secas com jatos de ar comprimido.

3.5.2 Obtenção de filmes de galactomanana purificada em monocamada

Placas de silício amino-funcionalizadas ou não foram mergulhadas em soluções de galactomanana. O tempo de contato para a adsorção foi de 4 h.

Experimentos de dessorção foram feitos ao mergulhar os substratos contendo os polissacarídeos adsorvidos em seus respectivos solventes puros. Após 24h, as amostras foram retiradas da solução, lavadas, secas com jatos de N₂ e caracterizadas por elipsometria e AFM.

3.5.3 Obtenção de filmes contendo a mistura galactomanana-alginato em multicamadas

Para os filmes feitos por *layer-by-layer* (LBL), a composição foi realizada usando como polieletrólitos negativo a mistura de GML-AL, com 50% de cada polissacarídeo, à concentração final de 0,1 mg/mL em água purificada. Para prepará-la foram pesados os polissacarídeos, misturados e colocados para solubilizar juntos.

Como polieletrólitos positivos, que foram intercalados com a mistura GML-AL, usou-se a quitosana (CHI) (1mg/mL, com 10 mMol/L NaCl, solubilizada em ácido

acético, pH 4,2), o polipeptídeo poli-L-lisina (PLL) (1mg/mL, com 10 mMol/L NaCl), e o polímero poli(alilamina hidrocloreto) (PAH) (1mg/mL, com 10 mMol/L NaCl). Todos os sistemas foram feitos em pH 6,7 e crescidos sobre o substrato de silício. Na primeira camada, sobre o silício, sempre se usou o polímero PEI (Polymin® SNA, BASF Corp.) com concentração de 1 mg/mL, para potencializar e auxiliar na adsorção das camadas subsequentes, uma vez que possui na sua estrutura alta densidade de carga positiva.

As multicamadas dos filmes foram feitas alternando as soluções da mistura de polissacarídeos (GML-AL) como polianion com polímeros catiônicos (PAH, PLL e CHI) por diferentes métodos: imersão, *spray* e *spin-coating*.

No método de imersão, o silício já limpo foi imerso por 15 minutos em uma solução de PEI. Após esse tempo, a placa foi submetida ao processo de lavagem compreendido em duas etapas: 5 minutos de imersão em um frasco contendo água purificada, seguido de mais 5 minutos em outro frasco, também contendo água purificada. Esse processo foi feito para que o excesso de polímero fosse retirado da superfície no primeiro frasco. Então, o silício contendo uma camada de PEI foi imerso na mistura GML-AL (o poliânion) por 15 minutos. A primeira solução de lavagem usada foi o CaCl_2 , (45 mMol/L) onde as placas permaneciam 5 minutos, seguidas por mais 5 minutos de imersão em um frasco de água purificada. E, para fechar o ciclo, a placa contendo PEI + GM-AL foi transferida para uma solução de polycation por 15 minutos para a adsorção; e para o processo de lavagem foi aplicada a imersão subsequente 5 minutos cada, em dois frascos contendo água purificada. O ciclo foi repetido novamente (imersão poliânion, lavagem, polycation e lavagem), quantas vezes fossem necessárias para obter-se o número de camadas. Para fazer as leituras, as placas foram retiradas da solução de lavagem, secas com jatos de ar comprimido e lidas no elipsômetro.

Para o método de *spray*, soluções dos polímeros foram preparadas e colocadas em garrafas de *spray* Air-Boy (Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha). A placa de silício limpa foi colocada verticalmente em um anteparo. A solução de PEI foi borrifada durante 10 segundos sobre o substrato, seguida de solução de água purificada por mais 10 segundos, para a lavagem. Para a camada de poliânion, a solução da mistura GML-AL foi vaporizada por 5 segundos, após 15 segundos, a solução de CaCl_2 foi vaporizada por 5 segundos e após 15 segundos essa camada

foi vaporizada por 5 segundos com água purificada. A camada positiva foi preparada sobre a camada negativa vaporizando por 5 segundos a solução de polication. Após 15 segundos foi realizado o enxague por 10 segundos com água purificada. O ciclo (poliânion, lavagem, polication e lavagem) foi repetido quantas vezes necessárias para obter-se o número de camadas desejadas. As placas foram secas com jatos de ar, após a deposição da camada de polication para as leituras.

A deposição pelo método de *spin-coating* foi similar à metodologia usada para o *spray*, inclusive utilizando as mesmas garrafas de *spray* Air-Boy para dispensar as soluções. A placa de silício limpa foi colocada sobre o anteparo do equipamento *spin-coater* Laurell Technologies Corporation, EUA, modelo WS-650-15 e submetida à rotação de 10.000 rpm. A metodologia (tempo de vaporização e de adsorção) para cada camada foi a mesma usada para a deposição por *spray*. A solução de PEI foi primeiramente vaporizada sobre o substrato em rotação por 10 segundos, e 10 segundos de lavagem com água purificada. Em seguida, a mistura GML-AL foi vaporizada por 5 segundos sobre a camada de PEI, e após 15 segundos, as camadas foram lavadas repectivamente por 5 segundos com a solução de CaCl_2 e água purificada. Em seguida, a solução de polication foi borrifada por 5 segundos e após 15 segundos a água purificada foi vaporizada por 10 segundos. O ciclo (poliânion, lavagem, polication e lavagem) foi repetido quantas vezes fossem necessárias para obter-se o número de camadas desejadas. A placa de silício contendo o filme foi seca com jatos de ar comprimido e submetia às leituras pelo elipsômetro.

3.5.4 Acompanhamento do crescimento dos filmes de monocamadas e multicamadas por elipsometria

Para os cálculos necessários foram usados os seguintes índices de refração: Si (BRANDRUP; IMMERGUT, 1996): $n = 3.88$; SiO_2 (BRANDRUP; IMMERGUT, 1996): $n = 1,462$; APS: $n = 1,424$ (Fluka); BSA (CARTER; HO, 1994) $n = 1.52$. Assumiu-se o índice de refração para as camadas de polímeros como um valor constante de 1,465. Apesar desses procedimentos fornecerem valores de menor precisão quando comparados aos valores absolutos das espessuras dos filmes,

essa metodologia permite determinar rapidamente a espessura das camadas dos filmes (IZQUIERDO *et al.*, 2005).

As medidas elipsométricas para os filmes monocamadas foram realizadas em três campos diferentes da placa de silício, num elipsômetro DRE-ELX02 (Ratzeburg, Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda=632.8\text{nm}$), com ângulo de incidência ajustado em 70° . As medidas elipsométricas foram feitas em dez campos diferentes na placa de silício, para os filmes multicamadas foram realizadas num elipsômetro PLASMOS SD 2100 (Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda=632.8\text{nm}$), com ângulo de incidência ajustado em 70° . Todas as medidas foram feitas *ex situ*.

A capacidade de adsorção foi testada, onde a quantidade de material adsorvido Γ (mg/m^2) foi calculada através da EQUAÇÃO 2 (FUJIMOTO; PETRI, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 1995; MOTCHMANN *et al.*, 1991):

$$\Gamma = \frac{d_{\text{poli}} (n_{\text{poli}} - n_0)}{dn/dc} = d_{\text{poli}} c_{\text{poli}} \quad (2)$$

onde n_0 é o índice de refração da solução medido por um refratômetro Abbe, dn/dc é o incremento do índice de refração determinado por um refratômetro diferencial e c_{poli} é a concentração média dentro da camada. Para os presentes sistemas o n_0 foi considerado como um valor médio para cada concentração de amostra de polímeros e o dn/dc à temperatura de 23°C foi utilizado como sendo $0,16 \text{ mL/g}$.

3.5.5 Acompanhamento do crescimento de filmes multicamadas através da micro-balança de cristal de quartzo

O acompanhamento do crescimento dos filmes foi feito em duplicata pela técnica da dissipação e frequência em microbalança de cristal de quartzo (QCM-D), modelo Q-Sense 4, do Institut Charles Sadron, Estrasburgo, França. As soluções de polímeros foram solubilizadas nas mesmas concentrações usadas para crescer os filmes multicamadas, e injetadas ($700 \mu\text{L}$) alternadamente no equipamento que continha o cristal de ouro em uma célula de análise. A primeira camada injetada foi com o polímero PEI. Após o equilíbrio do sistema, foi realizado o procedimento de

lavagem para retirar o excesso de solução, injetando duas vezes 700 µL de água purificada, com intervalo de 2 minutos. Após o equilíbrio do sistema, foi injetada a mistura GML-AL, seguido do procedimento de lavagem. A lavagem para a mistura era feita ao injetar 700 µL de solução de CaCl_2 e, depois, mais 700 µL de água purificada. Em seguida, a camada de polycation foi adicionada ao sistema através da injeção de 700 µL da solução, após alcançar o equilíbrio o procedimento de lavagem com 700 µL NaCl 15 mMol/L foi realizado por duas vezes, com intervalo de 2 minutos. O ciclo foi repetido até alcançar o número de camadas desejadas.

O cristal de quartzo recoberto com ouro onde foi crescido o filme foi excitado em sua frequência fundamental. Também, a terceira, quinta e sétima ressonância de frequência foram empregadas. Com um mínimo de massa adicionada ao sistema, houve alteração na frequência de ressonância e o relaxamento de vibração pode ser medido.

3.5.6 Análises da superfície dos filmes por microscopia de força atômica

Os mapas topográficos e a forma de agregados foram obtidos utilizando o equipamento 5500 Agilent PicoPlus Molecular Imaging em modo contato, com cantilever de silício oscilando de 50-100 nm de amplitude e frequência de ressonância próxima a 300 kHz, em uma técnica não-destrutiva que usa modo Magnético AC Mode III (MAC mode). Quatro imagens foram feitas, para diferentes regiões dos filmes. As imagens foram escaneadas em regiões de 10 µm x 10 µm, 5 µm x 5 µm, 2 µm x 2 µm, e 1,4 µm x 1,4 µm, e o processamento de imagens e a determinação do valor rms (raiz quadrada média, expressão do inglês, *root mean square*) para a rugosidade da área escaneada dos filmes foram feitos usando o *software* Pico View.

3.5.7 Análises da superfície dos filmes monocamadas por Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X

As análises de XPS foram feitas em espectrofotômetro de fotoelétrons ESCA 3000 V.G. Microtech, no Departamento de Física da UFPR, com a colaboração e orientação do Prof. Dr. Wido Schraier. A radiação usada foi Mg K α e o espectro foi

feito com 100 eV de energia. As proporções dos elementos foram calculadas pelas áreas dos picos. O tratamento de dados foi feito usando o software XI SDP32 do equipamento. O processo de deconvolução usado para C_{1s} foi feito usando os elementos fornecidos pelo software. O vácuo usado na câmara de amostra foi em torno de 10^{-9} mbar.

3.6 APLICAÇÕES DOS FILMES GALACTOMANANA PURIFICADA

Esses experimentos foram feitos no IQ/USP-SP sob a colaboração e orientação da Prof. Dr. Denise F.S. Petri, ou no Instituto Charles Sadron, Strasburg-FR sob a colaboração e orientação do Prof. Dr. Gero Decher.

3.6.1 Interação dos filmes de galactomanana purificada com proteínas

A capacidade de adsorção de duas proteínas diferentes, a albumina (ALB) e a concanavalina (ConA) sobre filmes de GML foi avaliada.

A ConA (0,20 mg/mL) foi dissolvida em 0,10 mMol/L de NaCl. A adsorção foi realizada em pH 4,5, na presença de $MnCl_2$ e $CaCl_2$ 0,01 mol/L durante 4h, a 24°C. Os substratos contendo uma camada de galactomanana foram mergulhados na solução de ConA durante 3h. Então, as amostras foram lavadas com água destilada e secas com jato de N_2 e analisadas por elipsometria e AFM. Para a análise de adsorção por ligações específicas, 50 mMol de manose foram adicionados na solução de lectina, e então, a solução lectina + manose foi colocada sobre a placa de silício-APS contendo a galactomanana adsorvida.

A ALB (1,0 mg/mL) foi solubilizada em 10 mMol/L NaCl, em diferentes pHs (4-6) para verificar qual era o melhor para a adsorção. Nessas soluções foram mergulhados os substratos com os polissacarídeos, deixados por 3h, lavados, secos e analisados por elipsometria e AFM.

3.6.2 Interação dos filmes de galactomanana purificada com partículas virais

A capacidade de adsorção aos filmes de GML dos vírus da dengue, sorotipos 1, 2 e 3 foi avaliada. A afinidade entre as interfaces polissacarídeo-vírus, e a

especificidade na adsorção dos diferentes sorotipos foram estudadas. Os vírus foram preparados e doados pelo Prof. Benedito A. L. Fonseca (USP, Ribeirão Preto-SP).

A preparação dos vírus da dengue tipo 1 (DENV-1; cepa Mochizuki), vírus da dengue tipo 2 (DENV-2; cepa New Guinea) e vírus da dengue tipo 3 (DENV-3; cepa H87) foi feita ao crescer os vírus em células C6/36, cultivadas em meio L15 Leibowitz, suplementado com 2% de soro bovino termo-inativado, 150 U/mL de penicilina e com 100 U/mL de estreptomicina. A seguir, foram adicionados para infectar as monocamadas de células, incubados por 1h, a 28°C, e agitados a cada 15 min. Os sobrenadantes da cultura de células infectadas foram coletados após 7 dias da infecção, centrifugados, aliquotados e congelados a -80°C. Então, a infecção viral foi determinada através de RT-PCR, usando iniciadores sorotipos específicos (PAULA *et al.*, 2002). Para preparar altos títulos de vírus da dengue, o sobrenadante das culturas infectadas foi concentrado no filtro de 100-kDa do centrifugador Millipore Centricon®, (Amicon; Millipore).

As dispersões virais foram preparadas em uma concentração de 4 mg/mL, em tampão PBS, pH 7.2. As amostras de filmes de galactomanana foram mergulhadas durante 3h nas dispersões, a 36°C. Após, foram lavadas em água destilada, secas com jato de N₂ e analisadas por elipsometria e AFM.

3.6.3 Interação dos filmes de polieletrólitos em multicamadas com células HeLa

O cultivo celular de células HeLa sobre os filmes multicamadas, formados pela técnica do LBL descritas no item 3.5.3, foi testado frente à diferentes sistemas. Os filmes foram autoclavados a 120°C, por 20 minutos e depositados em placas de 12 poços estéreis. As células foram plaqueadas sobre os filmes e incubadas com meio MEM suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), 37°C, em 5% de CO₂, por tempos variando de 24h até 8 dias, para acompanhar o crescimento e o espalhamento das células. Foram feitas 4 repetições desses experimentos, em dias diferentes.

O acompanhamento foi realizado utilizando um microscópio óptico invertido e as análises com o reagente Trypan Blue (0,4 %, Sigma/Aldrich®), a fim de verificar a viabilidade das células crescidas sobre os filmes. Esses ensaios foram realizados no Instituto Charles Sadron, Strasbourg, França, sob a colaboração e orientação do Prof. Dr. Gero Decher.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO DA GALACTOMANANA E DO ALGINATO

4.1.1 Purificação e composição da galactomanana de sementes de Leucena

A galactomanana bruta extraída e deslipidificada por Valenga (2007) foi purificada por centrifugação e filtração para usar em aplicações biológicas, como a produção de nanofilmes para adsorção de proteínas, de vírus e de células. Essa galactomanana purificada foi denominada de GML.

Os valores de rendimentos e da relação Man/Gal para a amostra bruta e a purificada estão listados na TABELA 1.

TABELA 1 – VALORES DE RENDIMENTO E DA RAZÃO MAN/GAL OBTIDOS PARA A GALACTOMANANA DE LEUCENA

	Massa das sementes (g)	Amostra bruta (% m/m)	Amostra purificada (% m/m)
Rendimento	200	31,4	19,3
Man/Gal ^a		1,9	1,7

^aSAEMAN *et al.* (1954); SAWADEKER; SLONEKER; JEANES (1965)
FONTE: O autor (2011)

O valor de rendimento de 19,3% calculado para a amostra purificada em relação amostra bruta pode ser justificado porque as impurezas que estavam adsorvidas na solução de polissacarídeo. Frações de massas molares maiores da própria GML também podem ter sido retidas. O valor obtido para o rendimento da galactomanana bruta, ou seja, antes do processo de centrifugação e filtração, com relação à massa das sementes totais (31,4%) foi semelhante ao encontrado por LUCYSZYN (2004) que obteve 31%. Porém, o rendimento da amostra purificada foi mais alto daqueles obtido por ONO *et al* (2003) (17,5%), e por BUCKERIDGE, DIETRICH, MALUF (1987) (9,7-15,7%).

Devido ao maior grau de substituição por galactose da cadeia principal de manana (aumento de 10,5%), a galactomanana purificada apresentou maior solubilidade do que o polissacarídeo bruto.

4.1.2 Análise elementar da galactomanana purificada

Os resultados da análise elementar da galactomanana purificada estão demonstrados na TABELA 2. Essa análise possibilitou quantificar o teor de nitrogênio, carbono e hidrogênio do polissacarídeo. O maior valor quantificado foi encontrado para o átomo de carbono, como era esperado, já que o maior constituinte da amostra é um carboidrato.

TABELA 2 - VALORES DE ANÁLISE ELEMENTAR (C, H e N) DA GALACTOMANANA PURIFICADA

Polissacarídeo	Constituintes em % (m/m)		
	C	H	N
Galactomanana	37,43	6,88	0,42

FONTE: O Autor (2011)

O resultado obtido para o átomo de nitrogênio pode ser extrapolado para o teor de proteínas, considerando que a amostra não deve conter contaminações após o processo de purificação. Portanto, ao se multiplicar o valor da porcentagem obtida para o átomo de nitrogênio por 6,14 (para converter o nitrogênio em proteínas), o valor encontrado foi 2,58%. Análises anteriores de dosagem de proteínas realizadas pelo método colorimétrico de HARTREE (1972) forneceram a quantificação de 8% VALENGA (2007). Entretanto, a dosagem pelo método da análise elementar é mais precisa, já que métodos colorimétricos podem ter influência de alguns erros, como no preparo das soluções, na curva padrão, na pipetagem; além da interferência na coloração por reação de complexação pela composição com alguns aminoácidos presentes na estrutura da proteína.

4.1.3 Análise da composição do alginato por espectroscopia de ^1H -RMN

A análise de espectroscopia de ^1H -RMN é uma das principais técnicas usadas para a investigação da composição do alginato (TORRES *et al.*, 2007). A FIGURA 17 mostra o espectro obtido para a amostra de AL. O deslocamento em δ

5.06 corresponde ao próton anomérico do ácido gulurônico (G) e o deslocamento em δ 4,68 corresponde ao do próton anomérico do ácido manurônico (M). A relação entre as áreas dos deslocamentos forneceu a razão M/G de 1,0. A razão M/G do polissacarídeo alginato varia de acordo com a metodologia de extração e o local onde a alga foi coletada.

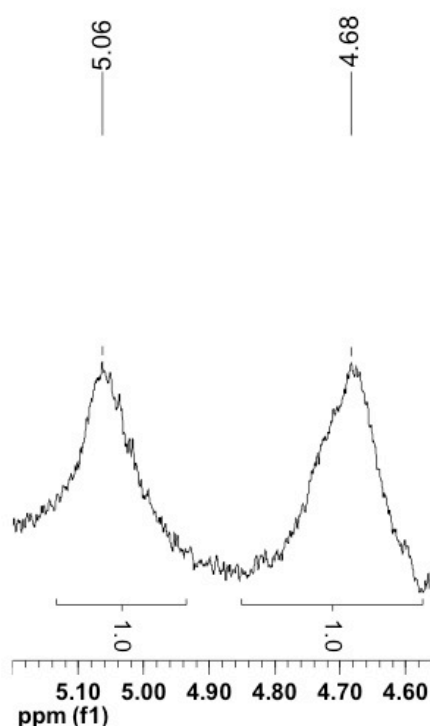


FIGURA 17 – ESPECTRO DE ¹H-RMN DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ALGINATO (AL), COM DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm, a 70 °C
FONTE: O Autor (2011)

A habilidade do alginato em formar géis é influenciada pela composição de ácido urônico (PENMAN; SANDERSON, 1972). Géis mais quebradiços são formados com alginatos com baixa razão M/G, enquanto que géis mais elásticos são formados com alta razão. Davis *et al.* (2003) analisaram alginatos extraídos da espécie de *Sargassum* e obtiveram relação M/G variando entre 0,52-0,57, próximos aos valores de 0,56-0,61 de Torres *et al.* (2007), mas diferente do encontrado por Fourest e Volesky (1997) que analisaram a mesma espécie de alga, porém de outra fonte, e calcularam uma relação M/G de 1,18. Valores maiores que 1,73 foram

obtidos para a espécie de *Laminaria trabeculata* (CHANDRIA; MATSUHIRO; VASQUEZ, 2001), e menores do que 1,73 para *Ascophyllum nodosum* (1,14-1,29), *Macrocystis pyrifera* (1,38) (PENMAN; SANDERSON, 1972) e *Laminaria digitata* (1,56) (GRASDALEN; LARSEN; SMIDSRØD, 1977).

4.2 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS DE SOLUÇÕES

4.2.1 Determinação da massa molar ponderal numérica média, raios de giração e hidrodinâmico, viscosidade intrínseca, e constante de Mark-Houwink da galactomanana, do alginato e da quitosana

A caracterização do tamanho e da forma macromolecular é importante para o estudo das aplicações de polissacarídeos. A cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz é uma técnica adequada para estudo de polissacarídeos em solução, pois é rápida e exige pequena quantidade de amostra.

As amostras de GML, AL e CHI foram analisadas após a ultrafiltração quanto à homogeneidade e seu grau de polidispersão (M_w/M_n) através dos detectores de índice de refração e espalhamento de luz laser. Calculou-se também a massa molar ponderal média (M_w) baseada na fração em massa das moléculas de determinada massa molecular, a numérica média (M_n), baseada no número de moléculas, a viscosidade intrínseca (VI), os raios de giração (R_g) e hidrodinâmico (R_h), e a constante de Mark-Houwink (α).

As dimensões de uma macromolécula em solução não podem ser definidas de forma absoluta, porque a forma do novelo molecular altera-se em função do tempo e das interações entre polímero e solvente. Assim, o tamanho macromolecular varia de molécula para molécula, mesmo com estruturas e massas moleculares idênticas. Portanto, pode ser definido somente em termos de propriedades médias (ROBINSON; ROSS-MURPHY; MORRIS, 1982; GIDLEY *et al.*, 1991; ROGER; AXELOS; COLONNA, 2000; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). As dimensões de uma molécula enovelada em solução dependerão das interações polímero-solvente. Quando existe uma boa interação entre o polímero e o solvente, as moléculas de solvente penetram facilmente no novelo polimérico, expandindo-o.

O tamanho que uma macromolécula assume em solução diluída é denominado volume hidrodinâmico. O principal parâmetro que define o tamanho molecular de uma macromolécula linear em solução é o R_g , que corresponde a raiz quadrática média entre um elemento do polímero e seu centro de gravidade (BERNE; PECORA, 1976), e fornece informações sobre as dimensões globais da cadeia. Esse valor é dependente de r^2 , que corresponde à distância quadrática média ponta a ponta ou extremo, e representa o módulo do vetor que conecta duas pontas de uma cadeia polimérica (BERNE; PECORA, 1976), sendo válido para macromoléculas lineares (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

A confiabilidade dos resultados obtidos pelo equipamento foi feita ao usar as amostras PEO e dextrana como padrões, cujos valores de massa molar média e IV foram fornecidos pelo fabricante do equipamento. O polietileno (PEO), com valores fornecidos de M_w 27.73 g/mol e IV 477,0 mL/g, obteve um valor de M_w 22.230 g/mol e de IV 383,0 mL/g. A dextrana, com M_w 70.67 g/mol e IV de 236,0 mL/g, obteve os valores de 70.65 g/mol e IV 244,8 mL/g. Como as análises foram próximas aos valores conhecidos, admitiu-se para as análises com amostras de GML, AL e CHI como valores confiáveis.

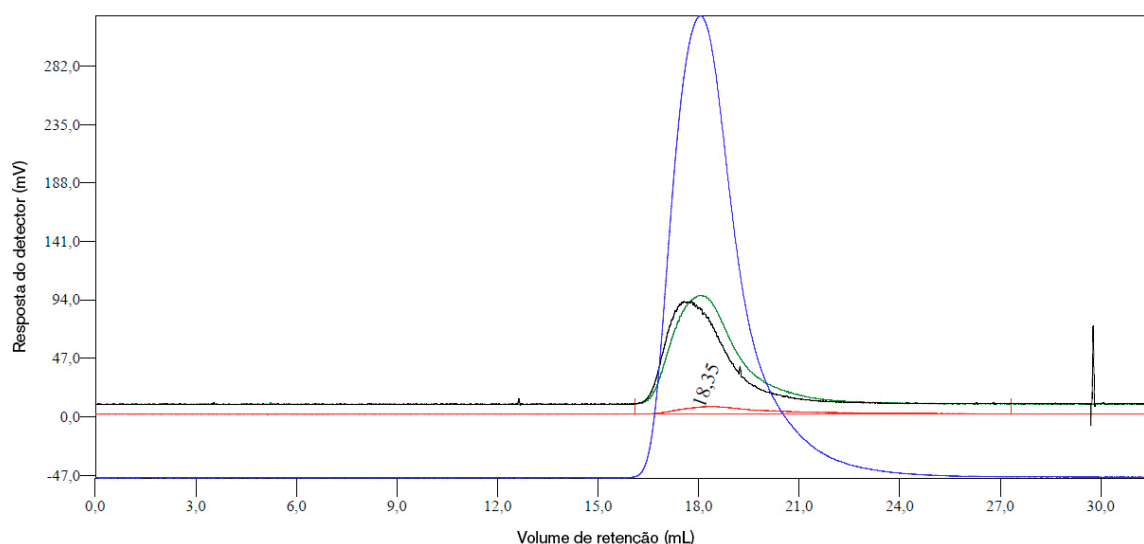


FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML), POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (VERMELHO, RALS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (AZUL), EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL, a 25°C

FONTE: O autor (2011)

A FIGURA 18 mostra o perfil obtido para a GML, que teve os volumes de eluição entre 15 e 24 mL, apresentando um perfil normal e homogêneo, revelando que processo de purificação da GML foi eficiente. Nas análises, o detector de índice de refração (IR) fornece um valor preciso da concentração presente na amostra; os detectores de espalhamentos de luz fornecem informações sobre a massa molar, enquanto que o viscosímetro fornece os valores de viscosidade intrínseca. O valor de dn/dc calculado para a GML foi de 0,136 mL/g e na TABELA 3, são mostrados os demais resultados obtidos.

TABELA 3 - VALORES DE MASSA MOLAR, POLIDISPERSÃO, RAO DE GIRAÇÃO, RAO HIDRODINÂMICO, VISCOSIDADE INTRÍNSECA E CONSTANTE DE MARK-HOUWINK PARA A GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ⁽¹⁾ EM SOLUÇÃO DE NITRATO DE SÓDIO 0,5 mg/mL, PARA O ALGINATO DE SÓDIO 1 mg/mL ⁽¹⁾ E PARA QUITOSANA ⁽¹⁾

Amostra	$M_w^{(2)}$	$M_n^{(2)}$	M_w/M_n	$R_g^{(3)}$	$R_h^{(3)}$	$[\eta]_d^{(4)}$	$\alpha^{(5)}$
GML	713.600	600.524	1,31	79,48	41,57	625,89	0,60
AL	299.927	165.642	1,81	61,82	33,16	981,60	0,70
CHI	75.532	69.140	1,09	36,47	16,18	373,01	0,60

⁽¹⁾ - por GPC Viscotek 270 Dual Detector, colunas PWxl 2500, 4000 e 6000, a 30°C, e detector viscosimétrico

⁽²⁾ - M_w e M_n em g/mol

⁽³⁾ - raio em nm

⁽⁴⁾ - viscosidade intrínseca em mL/g

⁽⁵⁾ - constante α de Mark-Houwink

FONTE: O autor (2011)

Os valores da massa molar, R_g e R_h da GML estão de acordo os descritos para outras galactomananas estudadas anteriormente. Souza (2009) obteve um valor de M_w de 899.000 g/mol, de R_g de 74,3 nm e R_h de 47,5 nm para a galactomanana obtida de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*, e para a galactomanana de goma guar obteve valores de M_w de 1.660.000 mol/L, R_g 95,7 nm e R_h 66,1 nm. A viscosidade intrínseca da GML foi de 625,80 mL/g, enquanto que a obtida por Souza (2009) para a *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* foi de 105,10 mL/g e de 119,0 mL/g para a goma guar. Valores de massa molar e de viscosidade intrínseca para galactomananas de leguminosas foram obtidos, também, na faixa de

700.000 a 3.000.000 g/mol, e 100 a 140 mL/g, respectivamente (BEER *et al.*, 1999; AZERO; ANDRADE, 2002; CUNHA *et al.*, 2007), sendo a variação de massa resultante da fonte e do processo de extração do polissacarídeo.

O valor de 0,60 da constante α de Mark-Houwink para a GML, indicou que esse polissacarídeo encontrava-se com conformação ao acaso, assim como os valores obtidos por Souza (2009). Para valores de $0 < \alpha < 0,5$ considera-se a molécula como uma esfera, e valores de $0,5 < \alpha < 0,8$ são relacionados para cadeias flexíveis de conformação ao acaso, enquanto que $0,8 < \alpha < 1,0$ para moléculas rígidas em forma de bastão ou alongadas (MOREIRA *et al.*, 2004; HARDING, 2005).

A FIGURA 19 mostra o perfil de eluição obtido para a amostra de alginato que eluiu entre os volumes de retenção de 16 a 24 mL, Com um perfil homogêneo e polidisperso para todos os detectores, indicando a pureza dessa amostra comercial.

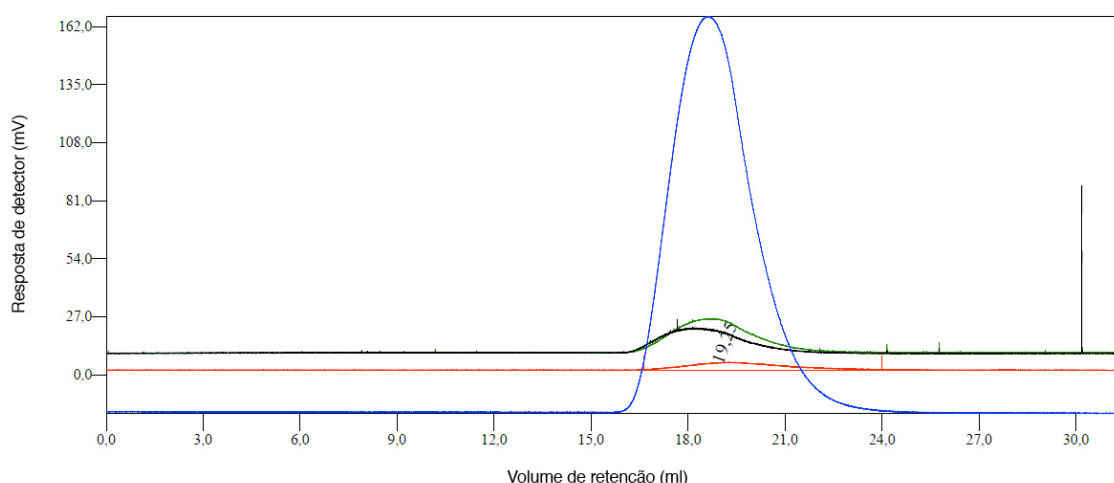


FIGURA 19 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ALGINATO DE SÓDIO POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (VERDE, RALLS) E A 7° (PRETO, LALLS), E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (VERMELHO), EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL, a 25°C
FONTE: O autor (2011)

O valor de dn/dc calculado para o alginato foi de 0,450 mL/g e, na TABELA 3, são mostrados os demais resultados obtidos. A massa molar determinada para o AL está em acordo com os descritos na literatura por Wedlock; Badruddin e Phillips (1985) que compararam por espalhamento de luz, a massa molar de alginatos de sódio extraídos das algas *Laminaria hyperborea* e *Ascophyllum nodosum*, obtendo

valores variando entre 140.000 - 643.000 g/mol. Hoagland *et al.* (1993), também, caracterizaram diferentes amostras de alginato de sódio, e obtiveram valores próximos a 300.000 g/mol de massa molar e 60 nm de R_g .

Smidsrød (1970) calculou o valor de 0,76 para a constante α de Mark-Houwink, em amostras de alginatos com grau de polidispersão próximos a 3. A amostra de AL utilizada nesse trabalho é menos polidispersa. O valor de α de 0,70, indica que esse polissacarídeo encontra-se com conformação ao acaso (MOREIRA *et al.*, 2004; HARDING, 2005).

O perfil de eluição obtido para a amostra de quitosana (FIGURA 20) mostra a eluição entre os volumes de retenção de 7 a 14 mL, Com um perfil homogêneo e polidisperso para todos os detectores, indicando a pureza dessa amostra comercial.

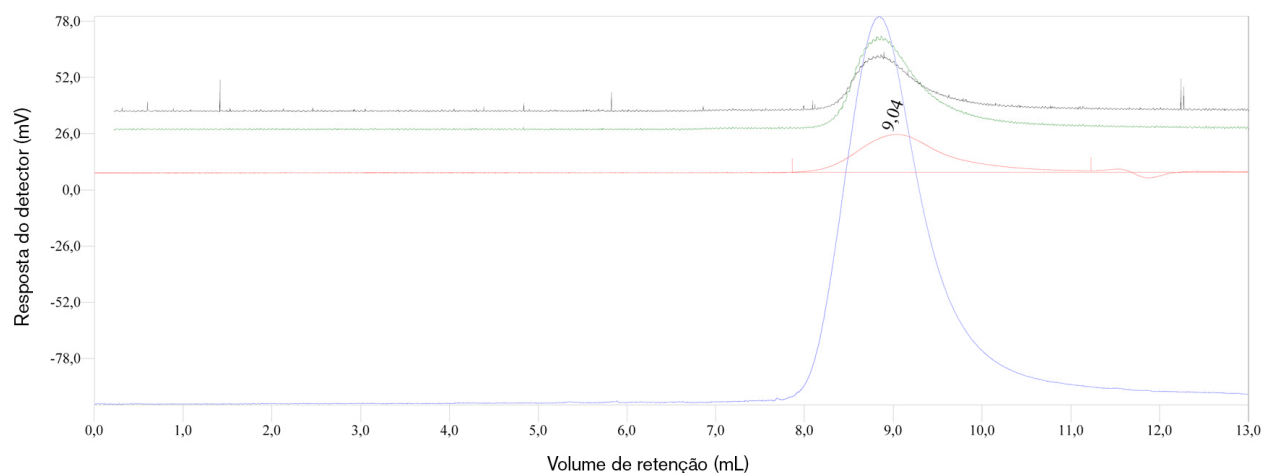


FIGURA 20 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA QUITOSANA POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (VERDE, RALLS) E A 7° (PRETO, LALLS), E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (VERMELHO), EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL, a 25°C

FONTE: O autor (2011)

A TABELA 3 apresenta os resultados obtidos para a quitosana, com dn/dc calculado de 0,1 mL/g. A quitosana comercial possui geralmente uma massa molar variando entre $10^4 - 10^6$ g/mol, e a sua polidispersão é influenciada por alguns fatores durante o processo de desacetilação, tais como, tempo, temperatura, concentração. A massa molar média determinada para a CHI foi de aproximadamente 75.000 g/mol, valor próximo ao obtido para quitosana com mesma taxa de desacetilação por Nguyen, Winnik e Buschmann (2009) quando estudaram a determinação da massa molar média de quitosanas com massa molar variando entre 90.000-210.000 g/mol, variando a concentração de sal na fase móvel. O raio de giração, a polidispersão e a massa molar

média também foram próximas aos valores obtidos por Augsten e Mäder (2007), que caracterizaram diferentes quitosanas, com diferentes graus de desacetilação, usando o espalhamento de luz associado ao fracionamento do campo de fluxo.

4.2.2 Análises por espectroscopia de fluorescência utilizando sonda de pireno de soluções de galactomanana e de alginato

Como o pireno é uma molécula hidrofóbica, com baixa solubilidade em água, a sua localização preferencial ocorre em domínios hidrofóbicos de moléculas anfipáticas (DOWLING; THOMAS, 1990). O espectro de emissão de fluorescência do pireno é sensível à polaridade do meio em que está presente. A FIGURA 21 mostra o espectro do pireno com as cinco bandas de emissão bem definidas entre 370 e 400 nm, sendo que a banda I, em 373 nm, tem sua intensidade aumentada na presença de solventes polares, enquanto que a banda III, em 383 nm, tem sua intensidade aumentada em solventes não polares. Portanto, a relação das intensidades das bandas vibracionais de fluorescência III/I pode ser usada como um sensor de hidrofobicidade (WINNIK, 1993). Essa metodologia tem sido empregada em estudos de comportamento polimérico em soluções (KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977; VIEIRA *et al.*, 2003, JÓ *et al.*, 2010), já que a relação entre essas duas bandas é alterada quando ocorrem mudanças nas polaridades do sistema onde a sonda está inserida, podendo indicar alterações conformacionais ocorridas nas moléculas.

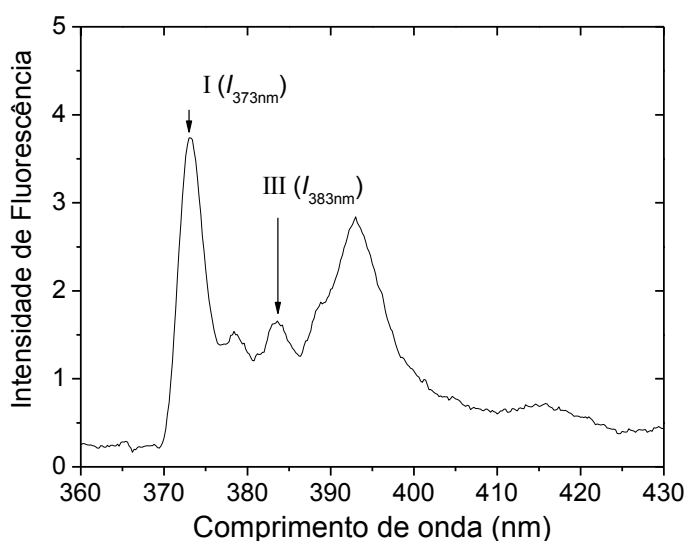


FIGURA 21 - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM SOLUÇÃO AQUOSA
FONTE: O Autor (2011)

A análise de emissão de fluorescência do pireno foi realizada tanto para as soluções contendo GML, quanto para as contendo AL. Concentrações crescentes de soluções de polímeros foram utilizadas para cada experimento. Os espectros forneceram as relações entre as bandas III/I que foram plotadas em um gráfico correlacionando a concentração de polissacarídeo versus a relação dos picos III/I (FIGURAS 22 e 23).

As FIGURAS 22 e 23 mostraram que com o aumento da concentração dos polímeros ocorreu, também, um aumento da razão picos III/I, indicando um aumento das regiões hidrofóbicas no sistema (AMIJI, 1995). Em baixas concentrações de ambos os polissacarídeos GML e AL, as relações entre os picos foi constante, mas em concentrações superiores a 1mg/mL é possível ver um aumento abrupto, indicando que o micro-ambiente de polaridade em que se encontra o pireno passa a ser hidrofóbico, considerando que o pireno deve estar incluso dentro dos domínios hidrofóbicos das cadeias dos polissacarídeos (YANG *et al.*, 2007b).

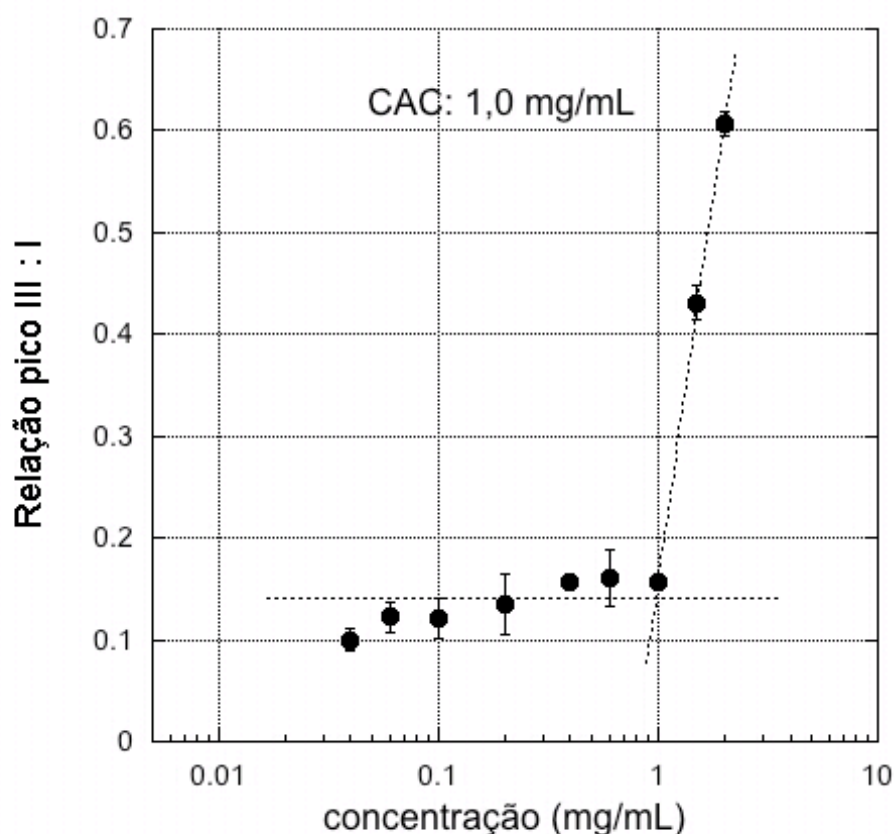


FIGURA 22 - GRÁFICO DA RELAÇÃO ENTRE OS PICOS III/I DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML), SOLUBILIZADA EM ÁGUA PURIFICADA, LEITURA EM ESPECTRÔMETRO DE FLUORESCÊNCIA, VARREDURA DE 360 – 500 nm

FONTE: O Autor (2011)

A relação entre os picos III/I para a GML (FIGURA 22) manteve-se próxima a 0,15. Souza (2009), estudando a galactomanana de pau-ferro e a galactomanana de goma guar, encontrou valores de 0,50 e 0,45 respectivamente. A menor relação obtida para a GML sugere a predominância de regiões mais polares para a galactomanana extraída de sementes de leucena. E as diferenças obtidas podem estar relacionadas às composições dos polímeros, cujas ramificações, mais ou menos substituídas, podem influenciar na hidrofilicidade da solução.

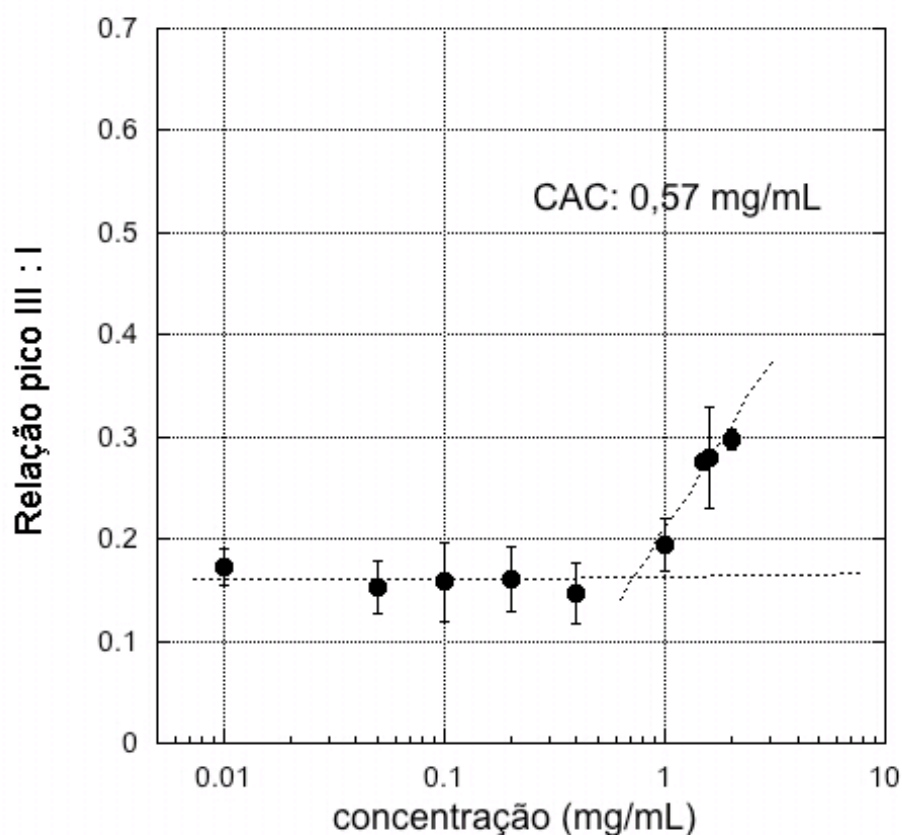


FIGURA 23 - GRÁFICO DA RELAÇÃO ENTRE OS PICOS III/I DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ALGINATO (AL), SOLUBILIZADO EM ÁGUA PURIFICADA, LEITURA EM ESPECTRÔMETRO DE FLUORESCÊNCIA, VARREDURA DE 360 – 500 nm
 FONTE: O Autor (2011)

A relação dos picos III/I (FIGURA 23) obtidos para o AL em concentrações inferiores a 1 mg/mL manteve-se próxima a 0,16. Esse valor é menor do que os encontrados para o pireno em solução aquosa (0,55) sugerindo que, nessas concentrações, as moléculas de pireno estão distribuídas nos microdomínios hidrofóbicos da cadeia de polímero (DONG; WINNIK, 1982). Quando a concentração

de alginato aumenta, simultaneamente o número de microdomínios hidrofóbicos aumenta, fazendo com que moléculas de pireno migrem para essas porções, acomodando-o melhor. Relatos da literatura (NEUMAN; SCHIMITT; IMAZAKI, 2003) descrevem essa relação próxima a 0,57, também em concentrações inferiores a 1 mg/mL.

Essas diferenças entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas podem ser decorrentes da diferença de composição e distribuição das unidades que compõe a cadeia dos alginatos.

As análises de fluorescência permitem determinar o valor da concentração crítica de agregação (CAC) (AMIJI, 1995). A CAC, em um gráfico que relaciona a concentração pela relação entre os picos III/I, é o ponto onde a curva muda sua tendência linear. O valor de CAC é um dos principais parâmetros termodinâmicos de uma agregação, sendo normalmente usado para avaliar a estabilidade de agregados em soluções aquosas (KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001; TIAN *et al.*, 2004).

O valor da CAC para a GML ao extrapolar as duas retas dos gráficos obtidos sobre a tangente das curvas foi próximo a 1 mg/mL (FIGURA 22). Este valor foi superior aos de pau ferro (0,29 mg/mL) e de goma guar (0,30 mg/mL) (SOUZA, 2009). Além dessas GMs divergirem em sua composição, outro fator que também pode ter influenciado no aumento da CAC para a GML foi a diferença das massas molares. A GM de pau ferro apresentou uma massa molar de $\sim 9 \times 10^5$ g/mol e a GM de goma guar de $1,6 \times 10^6$ (SOUZA, 2009) e a GML possui aproximadamente $7,1 \times 10^5$ g/mol. Assim, maiores quantidades de cadeia poliméricas de GML foram necessárias para atingir um estado de agregação (CAC), quando comparada com as galactomananas de pau ferro e de goma guar.

A CAC determinada para a amostra de AL foi aproximadamente 0,57 mg/mL (FIGURA 23), mais baixo do que o valor de 0,62 mg/mL para o alginato em contato com surfactantes (NEUMAN; SCHIMITT; IMAZAKI, 2003).

Os valores de CAC da GML e AL possibilitaram determinar as concentrações necessárias desses polissacarídeos para as soluções utilizadas na formação de filmes finos.

4.2.3 Análises por dicroísmo circular da solução de galactomanana, de alginato e das misturas galactomanana-alginato e galactomanana-alginato-albumina

O dicroísmo circular (CD) é um método sensível para investigar as interações entre polissacarídeos, através das mudanças de conformação das cadeias dessas moléculas que podem ocorrer em solução. Apesar de ser uma técnica difundida para a análise de proteínas e estudo quantitativos de suas estruturas secundárias, o CD também já foi utilizado para estudos com carboidratos, como por exemplo, carragenanas dos tipos ι - e λ - (SCHOELER *et al.*, 2006), κ - (NICKERSON; PAULSON; HALLET, 2004) e ainda alginato (AL-KHOURI, 2003), quitosana (SYNYTSYA *et al.*, 2007) e arabinogalactana-proteína de milho (KIELISZEWSKI *et al.*, 1992).

O espectro de CD foi analisado de 190-250 nm, pois as bandas típicas de polissacarídeos encontram-se na faixa de 194-240 nm (SYNYTSYA *et al.*, 2007). A FIGURA 24 mostra o espectro CD para as amostras de GML, AL, albumina (ALB) em soluções isoladas ou misturadas (1,0 mg/mL cada).

O espectro do AL resulta na sobreposição das unidades dos ácidos manurônicos e gulurônicos. As unidades de ácido manurônico apresentam uma banda negativa em aproximadamente 215 nm e uma banda positiva em 200 nm, o guluronato apresenta apenas uma banda negativa em 205 nm (DENTINI *et al.*, 2006). O espectro do AL obtido nesse trabalho apresentou duas bandas negativas próximas em 190 e 215 nm e uma banda positiva em 200 nm. Esse comportamento é decorrente da influência principalmente das unidades de ácido manurônico e das bandas das carboxílas presentes ao longo da cadeia de alginato (STEVENS, 1996).

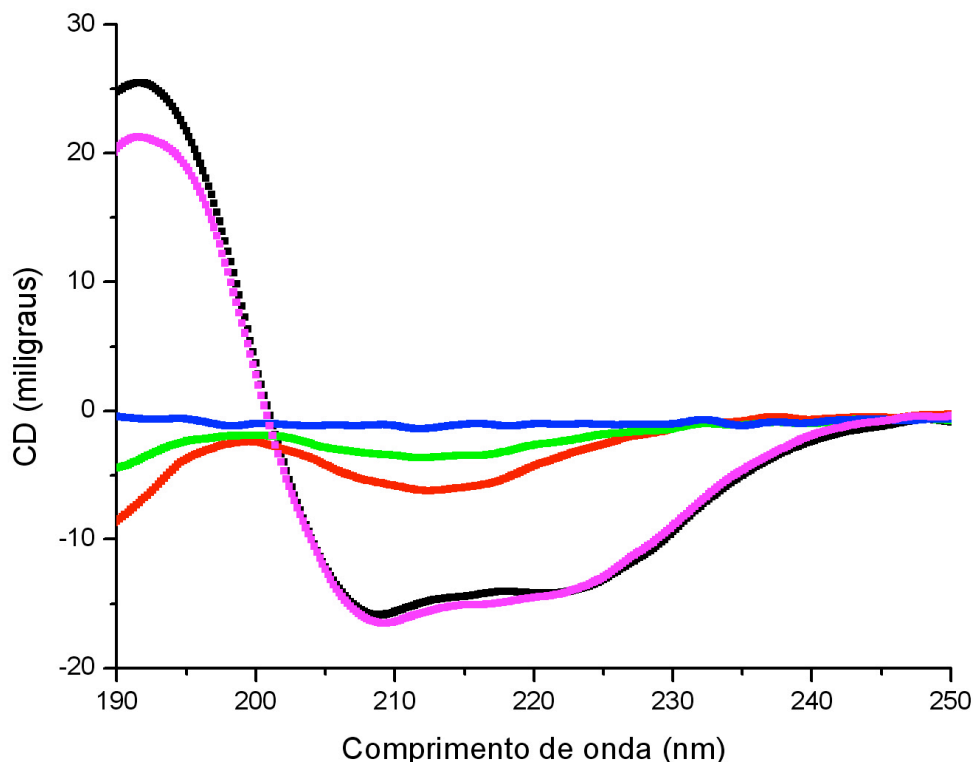


FIGURA 24 - GRÁFICO DE DICROÍSMO CIRCULAR DOS POLÍMEROS, A 1 mg/mL (□) GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML); (□) ALGINATO (AL); (□) ALBUMINA (ALB); (□) MISTURA GML-AL SEM ALBUMINA (ALB) e (□) COM 1,0 mg/mL DE ALB, EM ÁGUA PURIFICADA, A 25°C
 FONTE: O Autor (2011)

O espectro do AL resulta na sobreposição das unidades dos ácidos manurônicos e gulurônicos. As unidades de ácido manurônico apresentam uma banda negativa em aproximadamente 215 nm e uma banda positiva em 200 nm, o guluronato apresenta apenas uma banda negativa em 205 nm (DENTINI *et al.*, 2006). O espectro do AL obtido nesse trabalho apresentou duas bandas negativas próximas em 190 e 215 nm e uma banda positiva em 200 nm. Esse comportamento é decorrente da influência principalmente das unidades de ácido manurônico e das bandas das carboxilas presentes ao longo da cadeia de alginato (STEVENSON, 1996).

O espectro da GML apresentou comportamento típico de conformações ao acaso, em que nenhuma banda pronunciada é observada. Buffington *et al.* (1980) observaram que o espectro de CD de galactomananas depende da razão Gal/Man. Os carboidratos, quando em solução, ao contrário das proteínas que formam estruturas definidas, como α -hélice e folha β , frequentemente existem como cadeias desordenadas, tanto estendidas como colapsadas. Estruturas em hélice também

podem ocorrer com um grande número de unidades ao longo do eixo da hélice e ainda, os carboidratos de cadeia curta podem ser flexíveis ou relativamente rígidos (STEVENS, 1996). Esse comportamento de espectro obtido para a GML foi anteriormente observado para carragenanas (SCHOELER *et al.*, 2006) e xiloglucanas (JÓ, 2009a).

No espectro da mistura dos polissacarídeos observou-se que houve uma variação na conformação das cadeias, mesmo havendo um perfil predominante do alginato. Esse comportamento complementou os resultados obtidos por experimentos de reologia estudados por Valenga *et al.*, (2011) em que foi mostrado que esses polissacarídeos interagem entre si.

A adição de albumina à mistura de polissacarídeos (galactomanana-alginato) resultou em um perfil de espectro diferente dos anteriores. Em aproximadamente 190 nm houve uma banda pronunciada, seguida de outra significativa negativa em 210 nm. O espectro de CD da ALB exibe duas bandas negativas em aproximadamente 209 e 230 nm, características para a estrutura helicoidal da proteína (NAVEA *et al.*, 2006; OBERG; UVERSKY, 2001). A banda presente em 210 nm pode estar sendo influenciada pela presença da ALB na solução, enquanto que a em 190 nm deve estar sofrendo a influência da presença do AL. Essas análises complementaram os dados reológicos anteriores, nos quais se observou que a albumina pode interagir com a mistura de GML-AL.

4.2.4 Análises por cromatografia de permeação em gel da mistura galactomanana-albumina

Nas análises de formação relacionadas aos filmes de monocamadas de GML, foi testada a imobilização da proteína ALB sobre esse polissacarídeo. Portanto, para complementar os estudos de interação polissacarídeo-albumina foram realizadas análises por permeação em gel (GPC). O perfil de eluição da GML foi comparado com o perfil da mistura de GML-ALB (FIGURA 25 A e B). Também foi feito o perfil da solução de ALB como controle da análise (FIGURA 25 C).

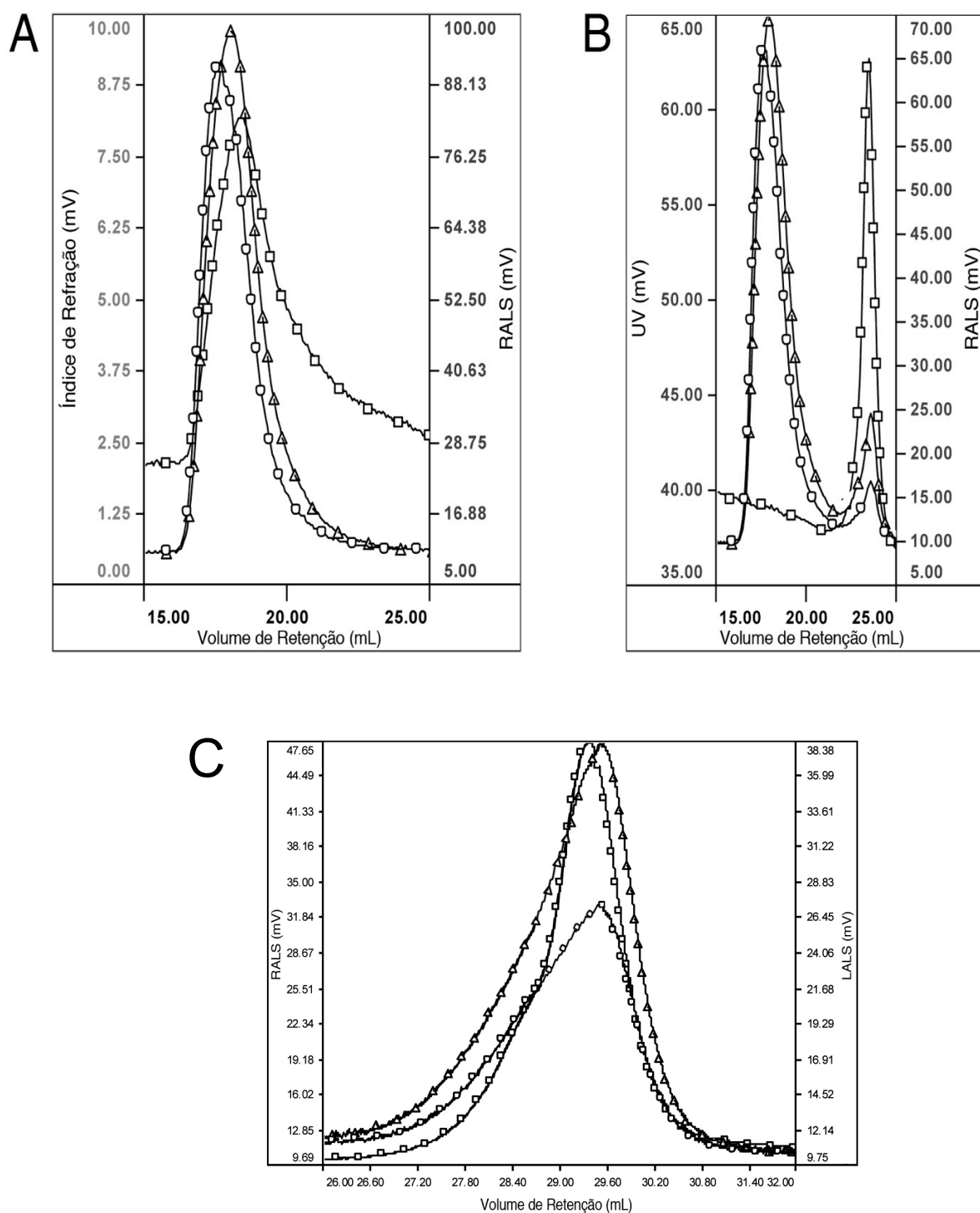


FIGURA 25 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) 1,0 mg/mL (A), DA MISTURA GALACTOMANANA-ALBUMINA (B) E DA SOLUÇÃO DE ALBUMINA (ALB) 1,0 mg/mL, POR DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (Δ , RALS) E A 7° (O, LALS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (\square) EM A E UV (\square) EM B E C, EM mV, EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RETENÇÃO, EM mL

FONTE: O autor (2011)

O espalhamento de luz da mistura GML-ALB (FIGURA 25B) sugeriu que a interação da proteína e polissacarídeo em solução deve ter ocorrido com a formação de agregados macromoleculares (excluídos entre 18-22 mL), sendo que parte pode ter ficado retida na membrana utilizada para a filtração e, entre 22 a 25 mL, foi excluída provavelmente a proteína. O perfil da GML, sem a albumina (FIGURA 24A) foi homogêneo e polidisperso; e o detector UV não detectou proteína em quantidade significativa. A FIGURA 25C, contendo apenas a solução de albumina foi usada como controle da análise, na qual a proteína eluiu em aproximadamente 29 mL, tendo também um perfil homogêneo.

4.2.5 Análises por reologia da mistura galactomanana-albumina em diferentes pHs

Em estudos anteriores de Valenga *et al.* (2011) os trabalhos reológicos de interação entre GML e AL foram iniciados. Para complementar esses dados, no presente trabalho foram efetuadas as análises reológicas para verificar o comportamento das misturas frente a diferentes pHs, com a presença e a ausência de íons cálcio. A concentração final da mistura foi 15 mg/mL, contendo 50% (m/m) de cada polissacarídeo. A FIGURA 26 mostra a curva de viscosidade dinâmica obtidas para essas misturas e em que se observou que, mesmo com pHs diferentes, as misturas de polissacarídeos apresentaram comportamentos de viscosidades aparentes muito próximos. Em baixas taxas de cisalhamento (até aproximadamente 8 1/s), esses apresentaram um patamar newtoniano, seguido de um comportamento pseudoplástico, em que houve uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, similar ao encontrado para outras soluções de polissacarídeos (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; SCHILLING *et al.*, 2002).

O AL em presença de alguns íons divalentes geleifica (GOMBOTZ; WEE, 1998). Portanto, em razão disso a reologia dos sistemas com íons cálcio também foi avaliada. A curva de fluxo obtida para as misturas mostrou que houve um aumento na viscosidade de quase dez vezes, por exemplo, a uma taxa de cisalhamento 10 1/s, quando foram adicionados íons cálcio em sistemas a pHs 7.2 e 11.2. Esse aumento de viscosidade sugere que os íons cálcio, mesmo na presença da galactomanana, ligaram-se às carboxilas dos blocos de ácidos gulurônico e/ou

manurônico presentes no alginato, formando a estrutura do tipo caixa de ovo (GOMBOTZ; WEE, 1998).

Em pH ácido, entretanto, a presença de íons cálcio não alterou a viscosidade do sistema, permanecendo praticamente os mesmos valores da mistura sem os íons divalentes. Esse comportamento é consequência do pKa do alginato, que foi relatado em literatura entre valores de 3,38 à 3,65, dependendo da composição das unidades de ácido manurônico e gulurônico (HAUG, 1961). Para uma estrutura contendo a mesma concentração das unidades, como o caso do AL desse trabalho, foi relatado um pKa de 3,44, tendo os grupos carboxilas ao longo da cadeia de alginato deprotonados em pH 6,0 (LAMELAS *et al.* 2005). Em pH 4,2, as carboxilas não estão deprotonadas o suficientes para se ligar aos íons cálcio e fazerem a geleificação do sistema, explicando, o comportamento da curva de fluxo semelhante ao sistema sem os íons cálcio.

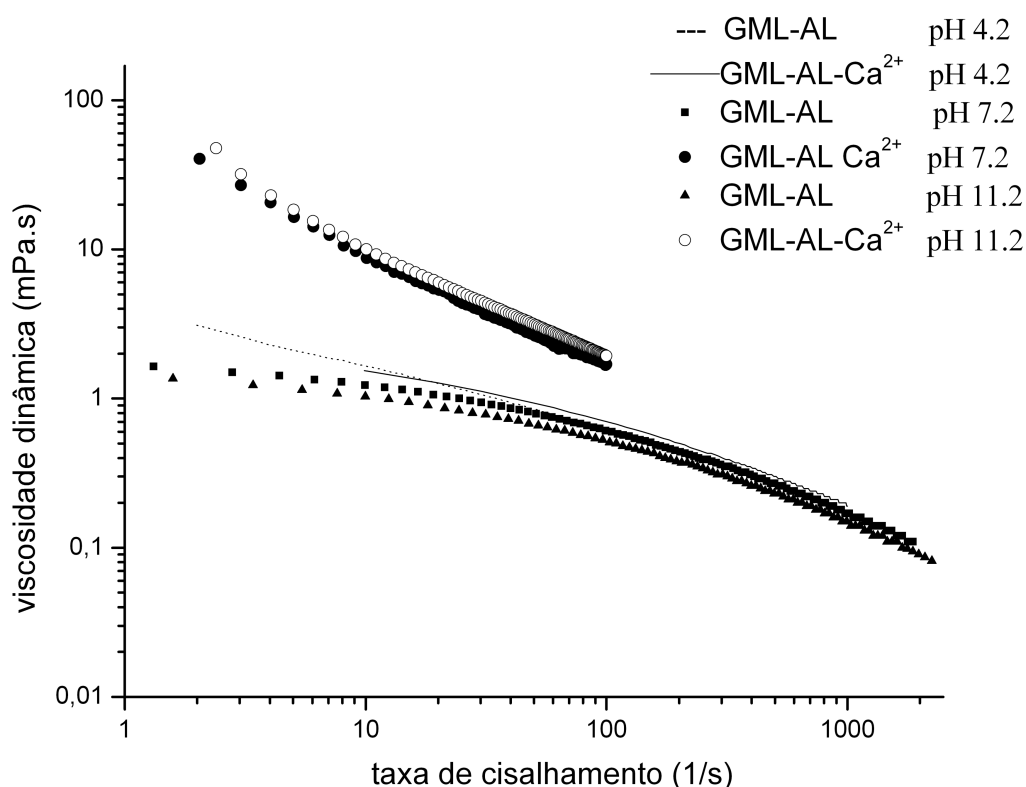


FIGURA 26 - CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS MISTURAS (15 mg/mL) DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)-ALGINATO (AL), EM SOLUÇÃO AQUOSA EM DIFERENTES pH, TAXA DE CISALHAMENTO DE 1 A $2 \cdot 10^3$ 1/s. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS 1, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C

FONTE: O Autor (2011)

Análises oscilatórias para as amostras contendo íons cálcio também foram realizadas, e as varreduras de tensão estão demonstradas na FIGURA 27 para os sistemas contendo GML-AL-Ca²⁺. As varreduras de tensão foram efetuadas em frequências de fixas de 0,1, 1,0 e 10 Hz (dados mostrados apenas para frequências de 1 e 10 Hz).

Os ensaios com diferentes frequências foram realizados porque a faixa de viscoelasticidade linear é dependente da frequência e, também, para se determinar a região de viscoelasticidade do sistema. Essa região é aquela em que a amostra permanece com as mesmas características reológicas, mesmo quando há o aumento da tensão.

As varreduras de tensão complementam os resultados obtidos pela curva de fluxo. Em todos os pHs, observou-se a presença do regime linear, no qual os módulos G' e G'' são constantes durante quase toda varredura de tensão. Na reologia oscilatória pode-se medir o caráter sólido da amostra através do módulo G' (módulo elástico). Quanto maior for o valor de G', maior é o caráter sólido (WALTER, 1998) e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (RAO, 1992). Além disso, pode-se medir o módulo de cisalhamento dinâmico viscoso ou de perda, G'', que indica o caráter líquido do material.

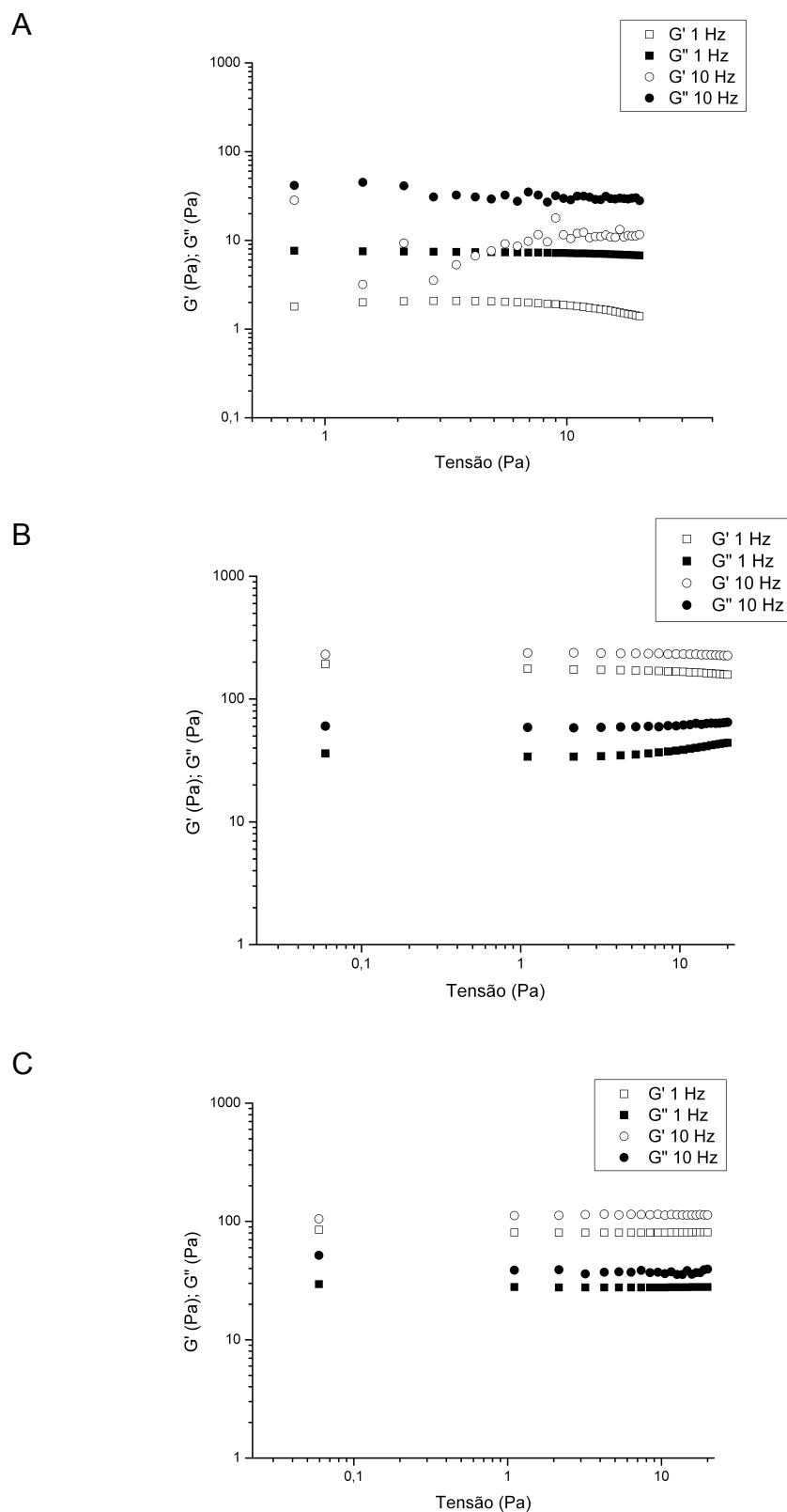


FIGURA 27 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15 mg/mL) DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)-ALGINATO (AL), CONTENDO 45 mMOL/L DE ÍONS CÁLCIO, pH 4,2 (A), pH 7,2 (B) e pH 11,2 (C); FREQUÊNCIAS FIXAS DE 1 e 10 Hz. LEITURAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS 1, SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25°C
 FONTE: O Autor (2011)

As misturas em pHs 7,2 e 11,2, contendo íons cálcio, apresentaram comportamentos similares e com valores de G' superiores ao de G'' para todas as faixa de frequências fixas analisadas. Ao contrário, em pH 4,2 os valores dos módulos elásticos foram inferiores aos módulos viscosos.

TABELA 4 – RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE G''/G' ($\tan \delta$) PARA OS SISTEMAS DE GALACTOMANANA-ALGINATO- Ca^{2+} NOS DIFERENTES pHs, EM TENSÃO FIXA DE 3 Pa

Amostra, pH	$\tan \delta$
GML-AL- Ca^{2+} , 4,2	3,57
GML-AL- Ca^{2+} , 7,2	0,19
GML-AL- Ca^{2+} , 11,2	0,34

FONTE: O Autor (2011)

Para poder comparar as propriedades viscoelásticas das amostras, a TABELA 4 mostra os valores de $\tan \delta$, calculado ao relacionar os valores de G''/G' , em uma tensão de 3 Pa. A determinação desse valor de $\tan \delta$ é importante porque ao relacionar os dois módulos pode-se caracterizar o comportamento da amostra, ou seja, se apresenta um caráter elástico ou viscoso. A diminuição da tangente é dependente da frequência e diminui durante a formação de um gel, indicando que o sistema torna-se cada vez mais elástico (WINTER; CHAMBON, 1986).

Nas misturas GML-AL- Ca^{2+} , a amostra em pH 4,2, apresentou o maior caráter viscoso, enquanto que em pHs 7,2 e 11,2 apresentaram o caráter de gel, sendo que em pH 7,2, o caráter de sólido foi ainda mais pronunciado. Esses dados mostraram que em pH 4,2, provavelmente, as cadeias de alginato não fizeram as ligações cruzadas tipo “egg-box” com os íons cálcio, e que seriam as responsáveis pela geleificação do sistema. Porém, nos pHs 7,2 e 11,2 as hidroxilas das cadeias do alginato de sódio poderiam estar ligadas aos íons cálcio.

Através das varreduras de tensão foi possível fixar uma tensão de 1 Pa, onde as misturas mantinham-se estáveis em relação às suas características viscoelásticas. As varreduras de frequência apresentadas (FIGURA 28) foram realizadas para as misturas nos pH 7.2 e 11.2, em que se obtiveram valores de G' maiores do que G'' na varredura de tensão.

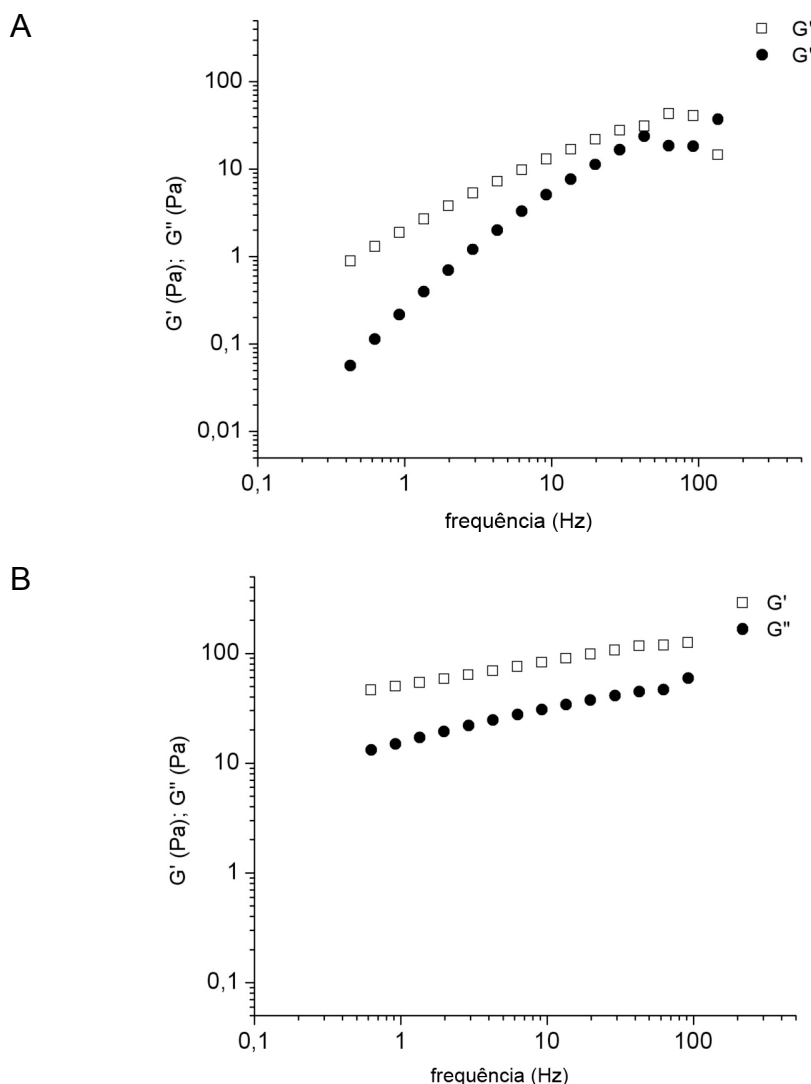


FIGURA 28 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg/mL) GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)-ALGINATO (AL) (A) pH 7,2 e (B) pH 11,2, CONTENDO 45 mMOL/L DE ÍONS CÁLCIO E TENSÃO FIXA DE 1Pa. (\square) G' , (\bullet) G'' . AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS 1, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C

FONTE: O Autor (2011)

As curvas de varredura de frequência para as misturas em pHs 7,2 e 11,2, mostraram que esse material apresentou características de gel, já que os valores de G' foram superiores aos de G'' desde as frequências menores (ROSS-MURPHY, 1988). Os módulos foram dependentes da frequência para as amostras em pH 7,2 e menos dependentes para as amostras de pH 11,2. Em frequências menores, a característica de gel foi acentuada para o sistema em pH 7,2, entretanto, quando há o aumento da frequência, o carácter elástico foi maior para a amostra em pH 11,2. Para o sistema em pH 7,2, em frequências maiores, os valores dos módulos

aproximaram-se, sugerindo que em frequências maiores deve ocorrer a formação de soluções viscoelásticas, com baixas taxas de ligações cruzadas entre os íons cálcio e o alginato no sistema, correspondendo a uma região de transição de gel para solução.

O comportamento na varredura de frequência observado para a amostra em pH 7,2 já foi observado para soluções de goma guar, em água, com concentração de 8 mg/mL (PAI; KHAN, 2002). Esse comportamento é típico de um biopolímero emaranhado em solução, em que o módulo G' é, inicialmente, maior do que o G'' , mas em frequências maiores há a presença de um ponto em que os módulos cruzam-se, e especialmente, as interações intercadeias se desfazem, prevalecendo o comportamento de solução.

4.2.6 Potencial zeta (Zp) das amostras de polieletrólitos

O potencial zeta (Zp) é uma propriedade física presente em todas as partículas que se encontram em suspensão. Os cientistas Derjaguin, Landau, Verwey e Overbreek desenvolveram a teoria DLVO, que envolve a estabilidade dos sistemas coloidais (DERJAGUIN; LANDAU, 1941; VERWEY; OVERBREEK, 1948). Como a maioria das partículas em suspensão apresentam uma carga de superfície, a teoria DLVO sugere que a estabilidade dessas partículas seja determinada pela soma de forças atrativas e forças repulsivas da dupla camada elétrica, quando essas se aproximam devido ao movimento browniano em solução. Essa dupla camada elétrica existe em torno de uma partícula, sendo resultado de íons e contra-íons na superfície da partícula. A camada de líquido que envolve a partícula apresenta íons que estão fortemente ligados e íons que estão mais dissociados. O potencial zeta corresponde potencial elétrico nesse campo hidrodinâmico de cisalhamento (SHAW, 1992).

Os potenciais zeta apresentados na TABELA 5 foram medidos para cada solução de polímero, nas mesmas condições de preparação para fazer os filmes finos (pH 6,7). Essa medida foi feita para investigar a carga das soluções que influencia no crescimento dos filmes possibilitando prever se ocorreria a adsorção dos polieletrólitos sobre o substrato. Quando os polímeros de cargas opostas dos polímeros são misturados e apresentam alto potencial zeta, a adsorção e interação

entre os polímeros é eletrostática. Quando os polieletrólitos não possuírem muitas cargas, a interação ocorrerá, principalmente, por ligações de hidrogênio (RICHERT *et al.*, 2004a).

TABELA 5 – DADOS DE POTENCIAL ZETA MEDIDOS, EM pH 6,7, PARA SOLUÇÕES DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML), ALGINATO (AL), PARA A MISTURA GML-AL, PARA O POLÍMERO POLI(ETILENIMINA) (PEI), PARA A POLI(ALILAMINA HIDROCLORADA) (PAH), PARA QUITOSANA (CHI) E PARA A POLI-L-LISINA (PLL)

Amostra	Potencial zeta (mV)	Desvio padrão
GML	-9,2	0,9
AL	-48,3	4,9
GML + AL	-38,9	2,5
PEI	+39,5	5,6
PAH	+18,9	4,5
CHI	+32,7	3,2
PLL	+7,3	3,9

FONTE: O autor (2011)

Geralmente, quando as partículas tem um Zp muito positivo, ou muito negativo (onde a positividade ou a negatividade são maiores ou menores do que +30 mV e -30 mV) as partículas repelem-se e a solução tende a ser estável. Por outro lado, quando esses valores são baixos, não há forças para prevenir a agregação dessas partículas (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005; CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011). Logo, pelos resultados obtidos na TABELA 5 a GML é a que apresentou a maior capacidade de agregação.

Com relação ao Zp dos polications, o PEI e a quitosana (CHI) apresentaram valores maiores de cargas positivas, enquanto que o PAH e a PLL apresentaram a positividade menor. O PEI e o PAH são polímeros sintéticos muito explorados em construção de filmes LBL que podem ser aplicados em diferentes campos de pesquisa. Já a aplicação da CHI e da PLL é essencialmente em filmes para fins biológicos. O fato da PLL e PAH apresentarem valores mais baixos pode ser decorrente da menor massa molar desses polications. Vargas *et al.* (2009) estudaram o Zp para a quitosana também em soluções de 1%, contendo ácido

acético e Tween 80, e obtiveram valores +62 mV, enquanto que CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* (2011) obtiveram valores variando entre +31,6 a +63,5 mV, os quais foram dependentes do pH e da concentração de polissacarídeo.

Para o poliânion alginato CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* (2011) obtiveram valores de -52 a -82,2 mV, os quais foram dependentes do pH e da concentração de cada amostra de polissacarídeo.

Segundo os resultados da TABELA 5 a GML apresentou um valor de Z_p , baixo ainda que negativo, mas que já era esperado por ser um polissacarídeo de estrutura neutra. Esse valor negativo pode ser explicado como proveniente de grupos hidroxilas presentes na estrutura da GML ou ainda pela presença de proteína na composição da amostra. O AL apresentou um valor negativo alto, de -48,3 mV, em razão da carga negativa presente e decorrente de sua constituição (ácidos manurônico e gulurônico). Com isso, o resultado da mistura final GM-AL apresentou uma carga final também com valores negativos altos. Sugerindo que na superfície desse filme predomina a presença do AL. Isso também confirma os resultados de comportamento reológico onde na mistura os resultados dos valores da viscosidade foram mais influenciados pela presença do alginato.

Os comportamentos da mistura GML-AL por potencial zeta, mostraram que essa poderia ser aplicada para o uso como um poliânion na formação de filmes multicamadas.

4.3 ENSAIO BIOQUÍMICO CELULAR

4.3.1 Análise de citotoxicidade da galactomanana e do alginato

Essa avaliação foi realizada para verificar se os polissacarídeos utilizados nesse trabalho apresentavam alguma toxicidade para as células e se poderiam ser aplicados em ensaios biológicos.

A viabilidade das células de fibroblasto de tecido conjuntivo de adipócitos de origem não tumoral (L929) foi medida através do método de MTT (FIGURA 29). O MTT (sal de tetrazólio), um sal hidrossolúvel e de cor amarelada, é convertido em cristais de formazan, de cor azul escura, pelas enzimas succinato desidrogenase

das mitocôndrias de células vivas (MOSMANN, 1983) avaliando dessa forma a morte celular.

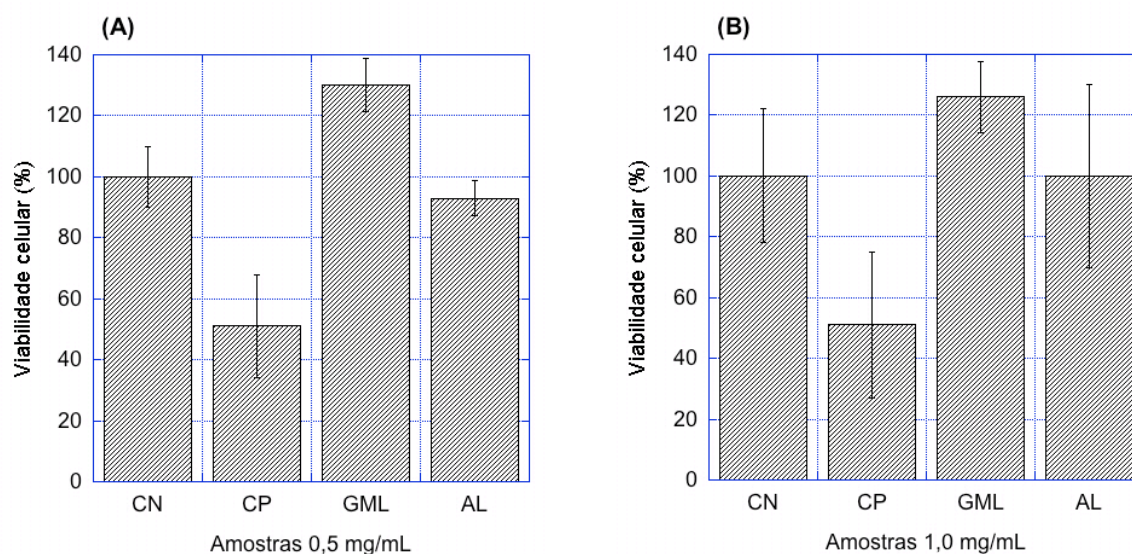


FIGURA 29 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS L929 EXPOSTAS POR 24h ÀS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) E ALGINATO (AL), EM CONCENTRAÇÕES DE 0,5 mg/mL (A) E 1,0 mg/mL (B), UTILIZANDO COMO CONTROLE NEGATIVO (CN) O TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS, pH 7,4) E O COMO CONTROLE POSITIVO (CP) O DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

FONTE: O autor (2011)

A FIGURA 29 mostra os resultados obtidos para o teste de MTT, onde em A os polissacarídeos foram solubilizados a uma concentração de 0,5 mg/mL e em B com concentração de 1,0 mg/mL. A viabilidade medida, após 24h de contato entre a amostra e as células, foi obtida através de dados comparativos a um controle negativo (PBS) e controle positivo (DMSO). Todas as amostras, em ambas as concentrações, apresentaram valores de viabilidade celular próximas ao controle negativo, assim como ausência de efeitos citotóxicos significativos, com CL_{50} (concentração letal de 50% das células em estudos) superior a 1 mg/mL.

Como esperado, a galactomanana apresentou baixa citotoxicidade. Na literatura, apenas galactomananas modificadas apresentaram citotoxicidade como, por exemplo, complexadas com íons oxovanádio (NOLETO *et al.*, 2009) que diminuíram a viabilidade de células HeLa em concentrações de 50-200 µg/mL.

4.4 FORMAÇÃO, ANÁLISE E APLICAÇÃO DOS FILMES

4.4.1 Filmes de galactomanana em monocamada

Filmes finos de polissacarídeos adsorvidos em superfícies sólidas são importantes, por exemplo, para a imobilização de biomoléculas. Por isso, a formação de monocamadas de GML sobre silício puro foi estudada. Para tentar induzir a adsorção foi utilizado um potencial iônico com diferentes concentrações de NaCl. Entretanto, a GML não interagiu com o substrato de silício. Então, as placas de silícios, que possuem caráter aniônico, foram submetidas a um processo de silanização, pelo qual se recobriu o substrato com o reagente 3-aminopropiltrimetoxissilano (APS). O APS, através de uma reação química forneceu à camada de silício, grupamentos amino, que permaneceram covalentemente ligados à lâmina, induzindo a formação de uma camada catiônica. Alternar as cargas da camada do substrato é uma das técnicas para induzir a adsorção de alguns materiais. Apenas em presença de APS na superfície, a GML adsorveu. Na literatura, o pKb relatado para grupos aminopropil é 3,3, a 20°C (HOOGENDAM *et al.*, 1998). Em pH 4,0, condição que foram realizadas as análises, a GML adsorveu, provavelmente, porque devem estar ocorrendo interações do tipo íon-dipolo entre as hidroxilas do polissacarídeo e os grupamentos amino terminal, carregados positivamente, do APS.

Para determinar a melhor concentração de GML que iria adsorver nas placas de silício, foi realizada uma isoterma de adsorção, utilizando diferentes concentrações de GML solubilizadas em solução de NaCl 10 mMol/L e em pH 4,0. A FIGURA 30 mostra os resultados obtidos para adsorção, após 4 horas de contato da solução do polissacarídeo com as placas de silício. Em concentrações entre 0,5 a 1,5 mg/mL, observou-se a formação de um nanofilme com uma espessura em torno de 1,5 nm. Em concentrações maiores (2 mg/mL) a espessura obtida foi de aproximadamente 3 nm. Entretanto, como a finalidade do trabalho era a adsorção de proteínas ou partículas virais sobre a camada de polissacarídeo, para as análises posteriores foi fixada a concentração de 1 mg/mL, que corresponde à concentração crítica de agregação da GML, conforme resultados obtidos por espectro de fluorescência. A concentração menor foi escolhida para diminuir a probabilidade de

agregação de partículas, que pode ocorrer em concentrações maiores, e evitar a formação um filme não homogêneo de polissacarídeo.

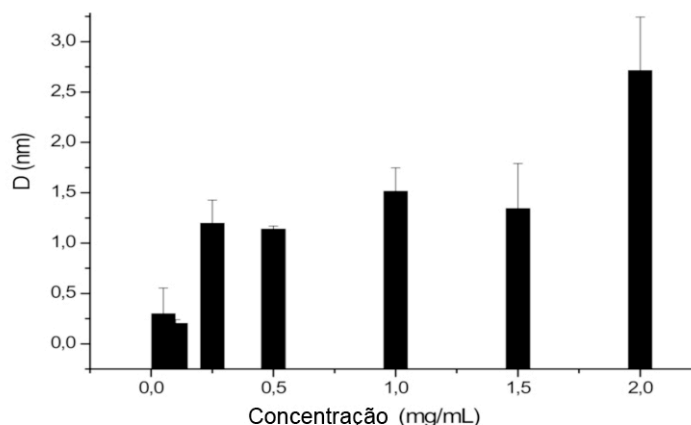


FIGURA 30 – VALORES MÉDIOS DE ESPESSURA (D) DE FILMES EM nm, DETERMINADOS POR ELIPSOMETRIA, OBTIDOS PARA A GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) SOLUBILIZADA EM NaCl, pH 4,0, DEPOSITADA EM PLACAS DE SILÍCIO AMINO FUNCIONALIZADAS

FONTE: O Autor (2011)

A elipsometria fornece a espessura média dos filmes, mas não os detalhes topográficos da camada adsorvida. Com isso a análise da morfologia por AFM foi usada como uma ferramenta complementar na caracterização dos filmes finos, já que fornece detalhes de superfície da camada adsorvida. A FIGURA 31 mostra a imagem topográfica obtida para a GML adsorvida sobre APS-silício. Além de uma camada relativamente homogênea, foram observados também alguns agregados cujos tamanhos são de aproximadamente 1,5 nm de altura. Esses agregados de polímeros, provavelmente, já estavam na solução usada para a adsorção, pois a GML estava em concentração limite de solubilidade.

Ensaio de dessorção também foram realizados. Nesses, as placas funcionalizadas contendo GML adsorvidas foram colocadas em contato com água destilada por mais 24 horas, para se verificar o comportamento do polissacarídeo em função do tempo. O resultado obtido mostrou que não houve diminuição da quantidade do material adsorvido, indicando que não houve dessorção de GML do suporte.

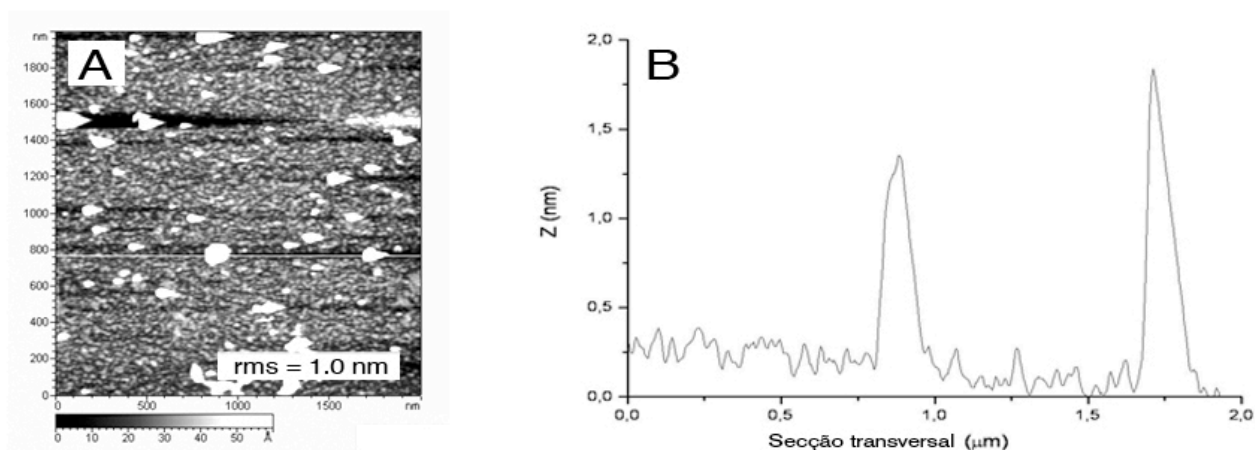


FIGURA 31 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA ($2 \times 2 \mu\text{m}$) DE FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO – APS (A), REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)
 FONTE: O Autor (2011)

A elipsometria forneceu a espessura média e a AFM forneceu a morfologia dos filmes. Mas, para comprovar qual era real composição química dos filmes desses filmes em monocamadas, foram feitas as análises de XPS (Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X). A análise de XPS é capaz de fornecer valores da composição relativa elementar de cada componente da amostra. O espectro amplo obtido para a galactomanana adsorvida em silício-APS está demonstrado na FIGURA 32.

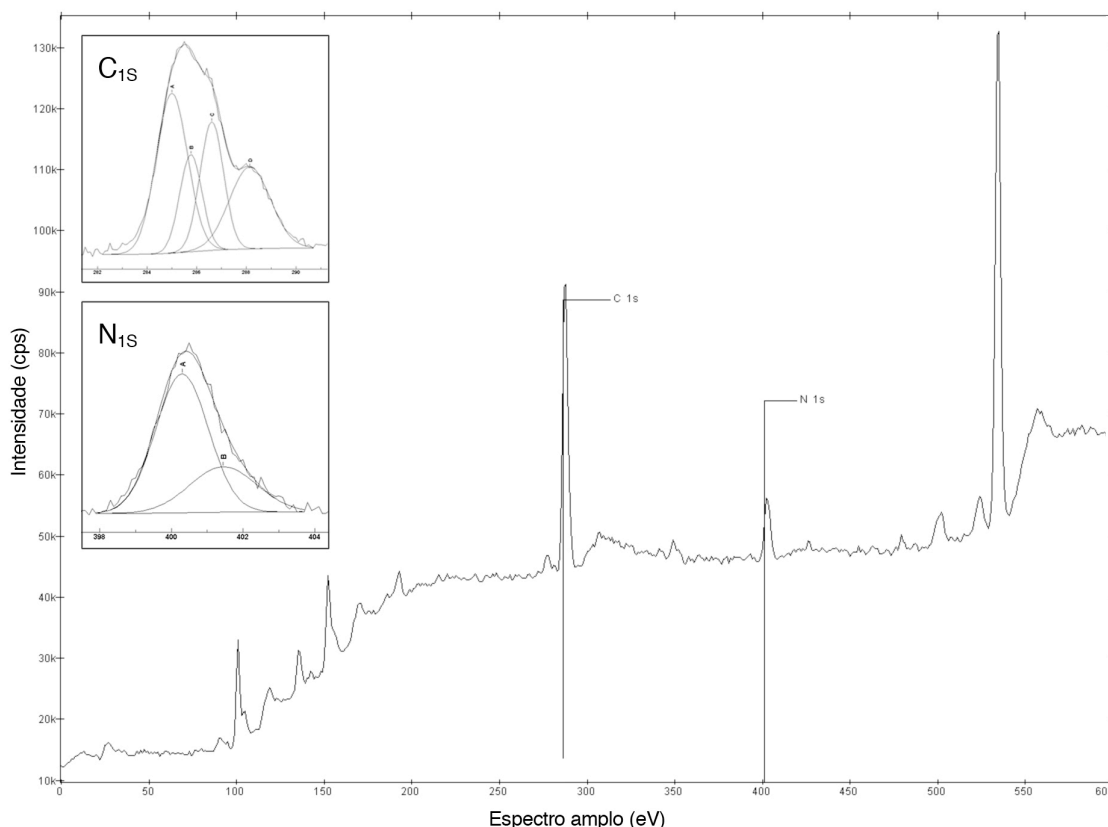


FIGURA 32: AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA O FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C_{1s} E N_{1s}
 FONTE: O Autor (2011)

No espectro amplo, pode-se ver picos mais proeminentes que equivaleram aos átomos de carbono (285,0 eV), nitrogênio (399,0 eV) e oxigênio (531,0 eV). O átomo de oxigênio pode estar relacionado tanto ao da amostra de polissacarídeo, quanto da amostra de silício; portanto, esse átomo foi descartado para o cálculo de composição relativa.

A proporção relativa elementar presente na amostra foi de 88,4%, para o átomo de carbono e 11,5% para o nitrogênio. No espectro, em baixas energias de ligação, observaram-se os picos referente ao silício. Uma baixa concentração do íon sódio é observada em energia próxima a 500 eV, porém não foram detectados os íons cloro, que poderiam ter ficado adsorvidos no filme juntamente com a GML.

Os dados obtidos no espectro de C_{1s} estão representados na TABELA 6 e os dados de N_{1s} estão na TABELA 7. Os diferentes átomos de carbono podem ser

distinguidos de acordo com o número de ligações do C com outros átomos. Por exemplo, uma ligação do tipo C-O fornece um deslocamento no espectro diferente de ligações do tipo C-C ou O-C-O (CHILKOTI; RATNER, 1993). Pela deconvolução do espectro C_{1s} do filme, pode-se observar a presença de 3 picos para as ligações envolvendo os átomos de carbono na amostra. Esses três picos estão presentes nas energias de ligação 285,0 286,4 e 288,2 eV. A energia de ligação mais baixa corresponde às ligações envolvendo C-C e C-H, que podem estar relacionadas a GML. A ligação hemiacetal, proveniente da cadeia de açúcar da GML, e as ligações do tipo C-OH foram encontradas em maior proporção. Apenas 8,2% foi detectado em uma energia de ligação de 288,2 eV. Nesse valor, dois tipos de ligações podem estar presentes, a ligação do tipo acetal O-C-O, correspondente à cadeia do polissacarídeo ou a ligação entre o APS e a GML; e a ligação do tipo amida O=C-N.

Com relação ao espectro N_{1s} , observaram-se duas ligações que envolvem o átomo de nitrogênio, uma ligação amina e outra amida, que devem ser relacionadas ao APS presente sobre o substrato ou ainda com a presença de algumas proteínas que foram observadas na análise elementar da amostra de GML purificada.

TABELA 6: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE O SILÍCIO – APS

Função química C_{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Alquil	C-C e C-H	285,0	49,6
Álcool	C-O	286,4	42,4
Acetal /Amida	O-C-O / O=C-N	288,2	8,2

FONTE: O Autor (2011)

TABELA 7: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE O SILÍCIO – APS

Função química N_{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Amina	C-N	399,9	58,4
Amida	O=C-N	401,8	41,6

FONTE: O Autor (2011)

4.4.2 Aplicações dos filmes de galactomanana em monocamada

4.4.2.1 Interação dos filmes de galactomanana com proteínas

4.4.2.1.1 Interação dos filmes com albumina

Através do filme formado de GML sobre o silício aminofuncionalizado, foi testada a interação de proteínas sobre o polissacarídeo. A albumina (ALB) foi uma das proteínas escolhidas como proteína-modelo, por ser um dos principais componentes do sangue e por ter larga aplicação em diagnósticos.

A imobilização da ALB sobre a superfície da GML em diferentes pHs foi investigada, mantendo o mesmo potencial iônico. A FIGURA 33 mostra que a variação do pH do meio entre 2-6 provocou mudanças na adsorção da ALB sobre o filme de GML adsorvido sobre o silício-APS. A variação do pH no meio, provavelmente, originou uma mudança nas cargas superficiais da ALB afetando assim a sua ligação com o substrato. Em pH 5.5, que é o ponto isoelétrico (pI) da albumina (CARTER; HO, 1994), houve a formação de um filme mais espesso. Acima do pH 5.5, como a proteína estava carregada negativamente não houve adsorção e nem formação de filmes.

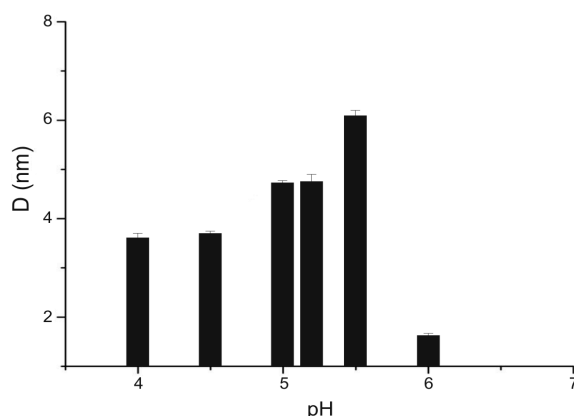


FIGURA 33 – ESPESSURAS DE FILMES DE ALBUMINA EM DIFERENTES pHs ADSORVIDOS SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)
FONTE: O Autor (2011)

Esse comportamento observado na FIGURA 33 foi similar ao obtido por Fujimoto *et al.* (2001), que avaliou a adsorção de ALB sobre superfície formada por

carboximetilcelulose (CMC)/quitosana, por Jó *et al.* (2009b) sobre superfície de xiloglucana e por Sierakowski *et al.* (2002) que usou galactomanana de *L. leucocephala* oxidada (LLOX) como filme-substrato. No entanto, a adsorção de ALB sobre LLOX formou filmes duas vezes mais espessos do que os formados pela GML. Essas variações em valores são aceitáveis já que as interações entre a proteína e as superfícies dependem de propriedades físico-químicas dos materiais envolvidos. Sabe-se que no pl o balanço final de cargas da albumina é nulo, mas ainda há presença de cargas positivas e negativas distribuídas na proteína (SEYREK *et al.*, 2003) que são suficientes para manter a adsorção no substrato (SCHWINTÉ *et al.*, 2002).

Para complementar as análises de topografia, imagens de AFM para a ALB imobilizada sobre a GML- APS-Si em pH 5.5 (FIGURA 34) foram realizadas. O filme formado tornou-se mais rugoso depois da adsorção da proteína, com a presença de partículas esféricas. A estrutura da albumina foi previamente caracterizada por cristalografia de raio-X (BECKER *et al.*, 1976) onde observou-se ser uma proteína globular, com dimensões de aproximadamente 8 nm por 3,8 nm. Esses valores podem ser relacionados aos obtidos para Z (FIGURA 34B) na representação gráfica da análise por AFM. Observou-se que algumas partículas mediram aproximadamente 8 e 16 nm, e que estão em concordância aos monômeros e aos dímeros da proteína adsorvida na superfície do polissacarídeo.

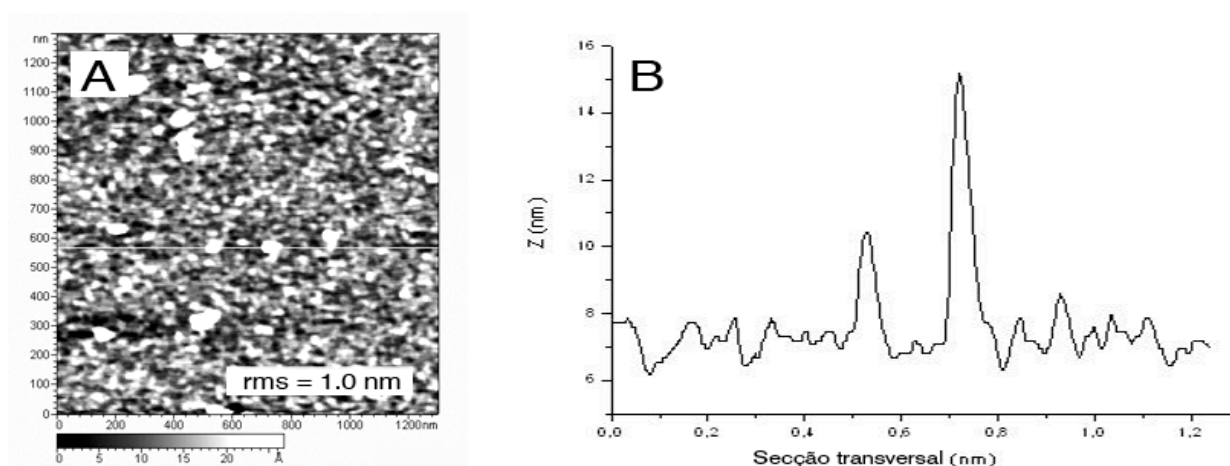


FIGURA 34 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (1,4 X 1,4 μm) DA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA EM pH 5,5 SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

Ensaio de dessorção, em 24 horas, também foram realizados para os filmes contendo albumina adsorvida sobre os filmes de GML. O resultado obtido mostrou que não houve alteração na espessura do filme, isto é, a proteína continuou adsorvida sobre o filme de GML (dados não apresentados).

As análises de microscopia de fluorescência foram feitas para os filmes depositados em monocamadas e constituídos de GML e ALB para a complementação e comprovação visual da adsorção desses biopolímeros. Para isso, a galactomanana foi marcada pela sonda fluorescente de Rodamina (GML-RO) e a albumina foi marcada com a sonda de fluoresceína (ALB-FL).

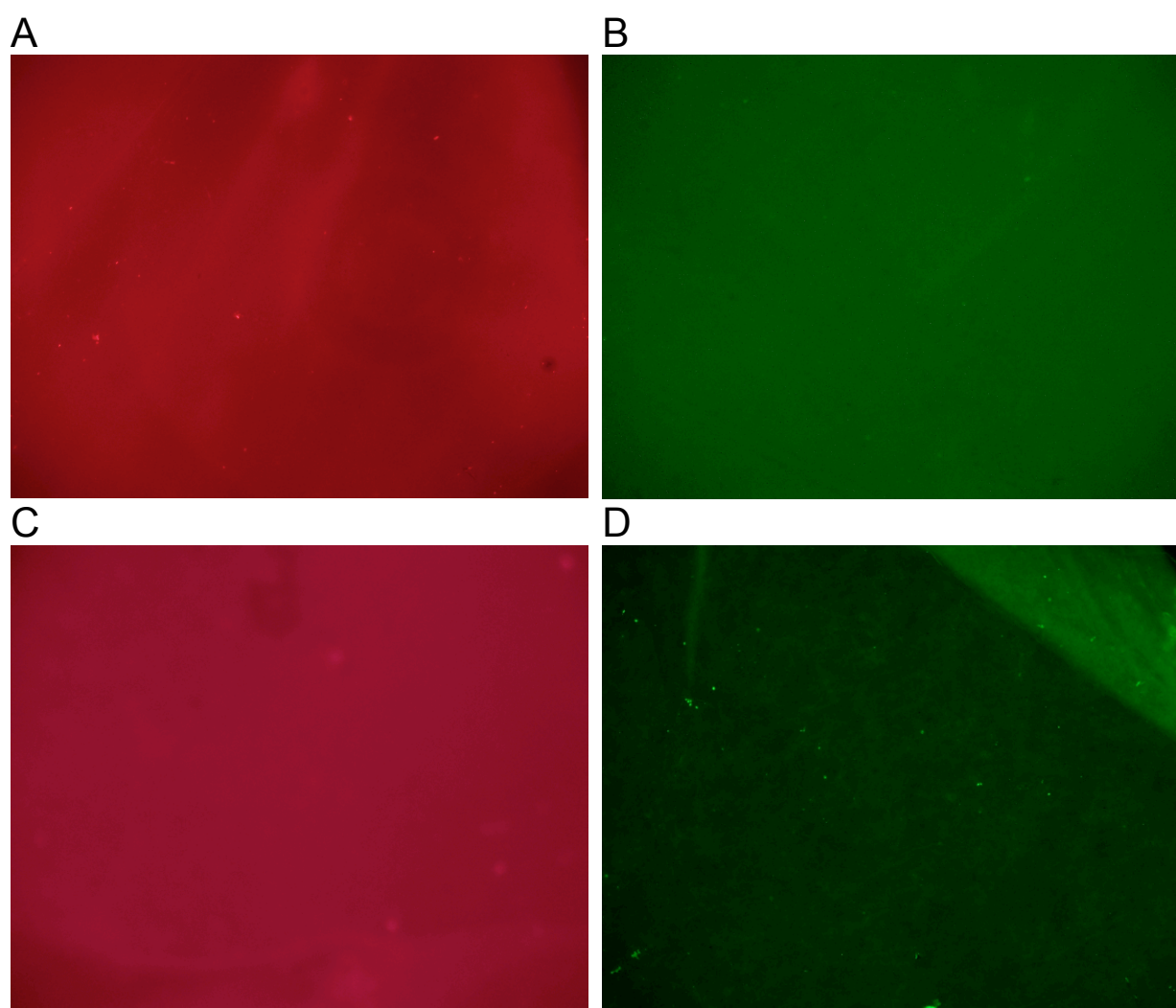


FIGURA 35 – IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. GML MARCADA COM RODAMINA (RO) E ALB COM FLUORESCÉINA (FL). (A) SOLUÇÃO GML-RO; (B) SOLUÇÃO ALB-FL; (C) FILME COM UMA MONOCAMADA DE GML-RO, E (D) FILME COM UMA MONOCAMADA DE GML SOBRE A QUAL FOI ADSORVIDA A ALB-FL

FONTE: O Autor (2011)

As FIGURA 35 A E B mostram as imagens de controle obtidas para as soluções de GM-RO e ALB-FL. À partir dessas soluções, fez-se a deposição das camadas de GML e BSA formando os filmes finos. A FIGURAS 35 C mostrou apenas a monocamada de GML. A presença da coloração vermelha da rodamina, que está complexada com a GML, comprovou que o polissacarídeo foi adsorvido sobre o substrato, mesmo após ser lavado. A FIGURA 35 D é a imagem obtida para o filme contendo a galactomanana e a ALB-FL adsorvida sobre o filme de GML. A presença da fluorescência comprova que há a adsorção de ALB e que essa proteína permanece na superfície, mesmo após o processo de lavagem.

Além das análises de microscopia de fluorescência, foram efetuadas as análises elementar por XPS da ALB adsorvida sobre o filme de GML. O espectro obtido para o filme ALB-GML-aminofuncionalizada está demonstrado na FIGURA 36.

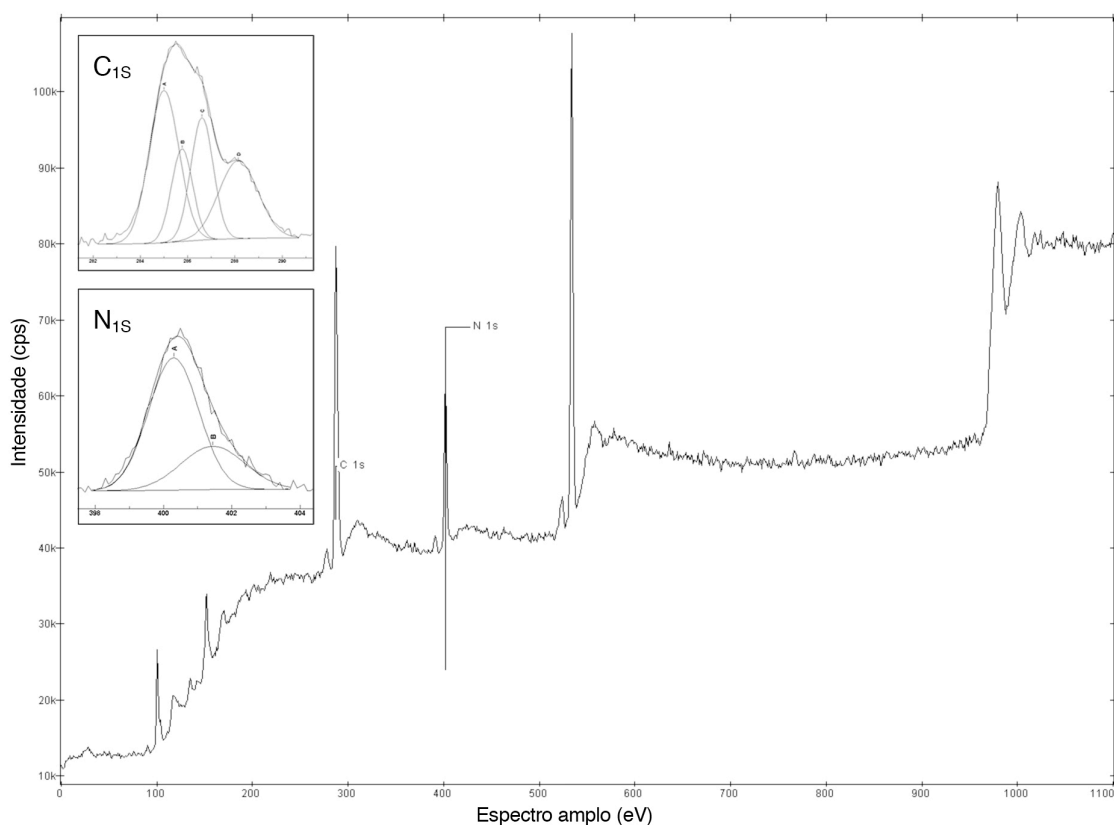


FIGURA 36: AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA A PROTEÍNA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVULUÇÃO DOS ESPECTROS DE C_{1s} E N_{1s}

FONTE: O Autor (2011)

No filme formado, observou-se a presença dos átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio, que estão presentes na composição química dos carboidratos e das proteínas. O espectro não apresentou picos referentes aos íons sódio e cloro, indicando que se há sal adsorvido, essa quantidade deve ser muito baixa para não ser detectada pelo equipamento. A proporção relativa envolvendo C:N apresentou na amostra um valor de 80,3% para o átomo de carbono e de 19,9% para o átomo de nitrogênio. Comparando-se esse espectro de XPS com aquele contendo apenas a GML (FIGURA 32), observa-se que houve um aumento de nitrogênio nos filmes, proveniente provavelmente da presença de proteína, que deve estar recobrando parte da GML.

Os dados obtidos dos espectros de C_{1s} e N_{1s} estão nas TABELAS 8 e 9, mostrando as proporções das diferentes ligações encontradas. A deconvolução do espectro de C_{1s} apresenta quatro tipos de energias de ligação, uma energia a mais do que apenas o espectro obtido para o filme de GML. Em 285,7 eV apareceu um novo pico, que pode ser relacionado a ligações do tipo amina. Além disso, houve um aumento na proporção das ligações envolvendo o átomo de nitrogênio, sendo uma porcentagem de aproximadamente 40% das ligações no espectro C_{1s} .

No espectro N_{1s} há a presença de duas energias de ligação, em 400,7 e 402,8 eV. Essas ligações correspondem às ligações do tipo amida e amina, respectivamente, sendo em maior proporção, as ligações amina. As ligações O=C-N e O-N são indicativas da presença de albumina na amostra, pois amidas são típicas de ligações peptídicas, que são encontradas nas proteínas.

TABELA 8: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)

Função química C_{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Alquil	C-C e C-H	285,0	37,0
Amina	C-N	285,7	15,9
Álcool	C-O	286,6	22,3
Amida	O=C-N	288,1	24,7

FONTE: O Autor (2011)

TABELA 9: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA ALBUMINA (ALB) IMOBILIZADA SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)

Função química N _{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Amida	O=C-N	400,7	24,7
Amina	O-N	402,8	75,3

FONTE: O Autor (2011)

Esses resultados juntos, somados aos obtidos pelos dados de elipsometria, AFM e microscopia comprovam a adsorção desses polímeros na formação de nanofilmes.

4.4.2.1.2 Interação dos filmes de galactomanana com a Concanavalina A

Outra proteína testada na monocamada de galactomanana foi a concanavalina (ConA), um modelo de lectina. As lectinas são proteínas que interagem, em presença de íons Mn²⁺ e Ca²⁺, especificamente com monômeros de glucose e manose. A adsorção foi feita em pH 4,5, na presença de MnCl₂ e CaCl₂ 0,01 mol/L durante 4h, a 24°C. A imagem de topografia (FIGURA 37), com corte transversal, mostra que a camada de ConA possui uma espessura média 2,0 nm (\pm 0,5), resultado esse que está de acordo com o valor de 1,6 nm obtido por elipsometria (dados não mostrados). Como a GML tem uma cadeia principal de manose substituída por unidades de galactose, pode-se concluir que, neste pH testado, interações eletrostáticas entre os segmentos de GML e a lectina carregada positivamente devem estar influenciando essa adsorção. O reconhecimento de sítios de ligação da ConA com manose tem uma constante de valor $2,2 \times 10^3$ 1/M (MANDEL; KISHORE; BREWER, 1994), o que também contribui para a adsorção.

A imagem de AFM (FIGURA 37), com área escaneada de 2 μ m x 2 μ m, mostrou que a proteína foi dispersa na topografia irregular do filme, com esferas em tamanho médio de aproximadamente 3,0 nm. Essas dimensões estão de acordo com a da lectina (BECKER *et al.*, 1976), cujo monômero apresentou-se com dimensões de 4,2 x 4,0 x 3,9 nm (REEKE; BECKER; EDELMAN, 1975), apesar de se saber que entre pH 5 – 6,7, a proteína tende a assumir a forma dimérica, em

contraste com a forma tetramétrica obtida quando em pHs mais altos (KALB; LUSTIG, 1968).

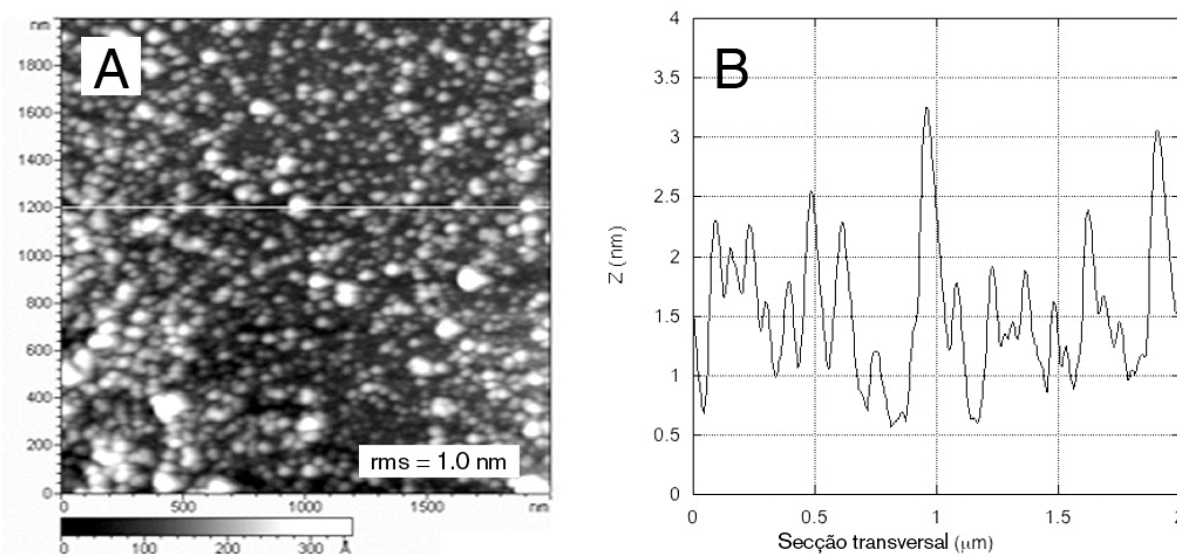


FIGURA 37 - IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DA PROTEÍNA CONCANAVALINA (ConA) A IMOBILIZADA SOBRE FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO – APS (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

Morfologias por análise de AFM e similares foram observadas para a ConA adsorvida em superfícies de polissacarídeos como CMC (CASTRO; KAPPL; PETRI, 2005), goma de caju (MACIEL *et.al.*, 2007) e filmes de xiloglucana (SIERAKOWSKI *et al.*, 2007), em que a espessura média foi $4,0 \pm 1,0$ nm, $2,5 \pm 0,5$ nm e $2,5 \pm 0,5$ nm, respectivamente.

O comportamento de adsorção de proteínas é ainda mais complexo do que o dos polieletrólitos, portanto a adsorção e a afinidade de ligação da lectina com filmes de GML-amino terminal foram avaliadas ao se testar o reconhecimento do sítio de ligação de carboidratos da ConA na presença de 50 mMol de manose, concentração suficiente para bloquear os sítios específicos dessa proteína (PEREIRA *et al.*, 2008). A afinidade da lectina por açúcares é atribuída à organização multivalente e espacial da molécula. Nesse trabalho, a solução de manose inibiu a adesão da lectina conforme dados obtidos por elipsometria, isso é as unidades de manose bloquearam o reconhecimento da ConA pelo sítio de ligação da GML, indicando que o sítio de reconhecimento de ligação da GML-ConA é específico.

Estudos de espectroscopia (REEKE; BECKER; EDELMAN, 1975) revelaram que o reconhecimento molecular da ConA por unidades de glucose em carboidratos possuem relação com as configurações de hidroxilas nos carbonos 3, 4 e 6. Por cristalografia de raios X do complexo ConA-metil- α -D-manopirranose (DEREWENDA *et al.*, 1989; RINI *et al.*, 1993) foi mostrado que os átomos de oxigênio O-3, O-4, O-5 e O-6 dos carboidratos estão diretamente ligados ao hidrogênio da proteína. Além disso, estudos sugeriram que modificações nas posições C-3, C-4 e C-6 da D-manopirranose, impediram a ligação do açúcar com a ConA (GOLDSTEIN; HOLLERMAN; SMITH, 1965). Apenas quando a substituição de um dos átomos de hidrogênio na posição C-6 foi um grupo hidroximetil (JAIPURI; COLLET; POHL, 2008) ocorreu a ligação da proteína. Isso porque a presença de moléculas de água localizadas próximas ao grupo hidroxil do C-6 não redutores da manose ajudou a mediar a interação do açúcar-lectina, estabilizando a ligação (SANDERS *et al.*, 2001; NAISMITH, FIELD, 1996, GOLDSTEIN; HOLLERMAN, SMITH, 1965).

Baseado nessa informação, e como a cadeia da GML é composta por β -D-(1 \rightarrow 4) manose, com a posição C-6 de algumas unidades substituídas por galactose, pode-se propor que o reconhecimento da ConA deve ser pelos OH dos grupos C-3 e C-6 da manose não substituída (KAKU; GOLDSTEIN, 1991).

Análises termodinâmicas mostraram que as interações carboidratos – lectinas são dirigidas por termos entálpicos (CARVER *et al.*, 1989; QUIOCHO, 1989), sugerindo que as interações GML-ConA estejam ocorrendo através de ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals. A interação lectina-carboidrato é importante porque pode fornecer informações em estudos de processos celulares e mecanismos de ligações ainda não bem identificados como, por exemplo, em processos de adesão celular e reconhecimento de patógeno através de carboidratos específicos no sistema imune, assim como no desenvolvimento de sondas (CASTRO; KAPPL; PETRI, 2005).

Além disso, sabe-se que o perfil estrutural das glicanas e seu reconhecimento particular por lectinas estão envolvidos na progressão da doença da dengue, fazendo com que as análises de ligação sacarídeo-lectina sejam um importante passo como ferramentas de diagnósticos (BOUVENG; LINDBERG, 1965).

Ensaio de dessorção, em 24 horas, também foram realizados para os filmes contendo a lectina adsorvida sobre os filmes de GML. O resultado obtido mostrou que não houve alteração na espessura do filme, isto é, a proteína continuou adsorvida sobre o filme de GML (dados não mostrados).

Análises de XPS foram feitas para o filme de ConA adsorvido sobre o de GML- silício amino terminal. O espectro obtido está demonstrado na FIGURA 38. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão presentes no filme e a proporção C:N calculada foi de 85,9% para o carbono e 14,1% para o nitrogênio.

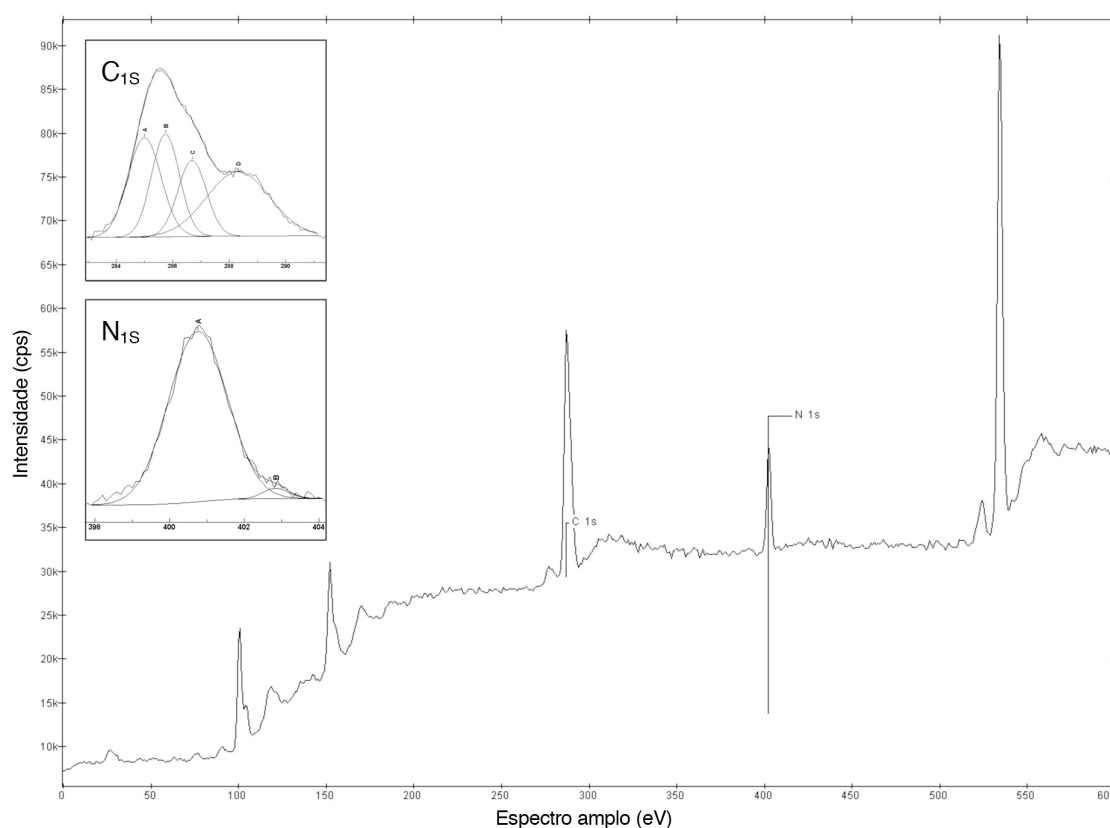


FIGURA 38: AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA A PROTEÍNA CONCAVALINA A (ConA) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C_{1s} E N_{1s}

FONTE: O Autor (2011)

As TABELAS 10 e 11 resumizam os dados encontrados nos picos de C_{1s} e N_{1s} . Pela deconvolução do espectro C_{1s} observa-se quatro energias de ligação para o átomo de carbono. A energia de ligação mais baixa, em 285,0 eV é relacionada a ligações do tipo C-C e C-H, e a energia em 286,6 eV corresponde a ligação C-O,

que podem ser decorrentes da presença GML no filme. A energia de ligação em 285,7 eV, que envolve ligações entre o átomo de carbono e de nitrogênio, está presente nesse filme, e não foi presenciada no filme contendo apenas a GML, indicando que nessa amostra houve a adsorção da proteína ConA.

Mais uma evidência da adsorção da ConA sobre o filme de GML pode ser observada na deconvolução do espectro N_{1s} . Nesse observa-se dois tipos de energia de ligação, uma em 400,7 eV, que corresponde a ligação do tipo amida, e uma em 402,8 eV que corresponde a ligação amina. Pode-se observar também que a maior parte de ligações envolvendo o nitrogênio na amostra está envolvida em ligações do tipo amida. A presença de amida no filme indica que houve a adsorção da ConA sobre a monocamada de GML, recobrindo parte desse polissacarídeo.

TABELA 10: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA CONCANAVALINA A (ConA) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)

Função química C_{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Alquil	C-C e C-H	285,0	26,7
Amina	C-N	285,7	23,1
Álcool	C-O	286,6	17,5
Amida	O=C-N	288,3	32,7

FONTE: O Autor (2011)

TABELA 11: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DA PROTEÍNA CONCANAVALINA A (ConA) IMOBILIZADA SOBRE FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)

Função química N_{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Amida	O=C-N	400,7	97,4
Amina	C-N	402,8	2,6

FONTE: O Autor (2011)

Esses dados comprovam a adsorção da proteína sobre o filme de GML-silício amino terminal, e complementaram os resultados obtidos pela elipsometria e por AFM.

4.4.2.2 Interação dos filmes de galactomanana com o vírus da dengue

A capacidade de adsorção da glicoproteína em silício recoberto por polissacarídeo motivou a investigação de estudos de moléculas mais complexas, como partículas do vírus da dengue. Para isso, foi analisada a adsorção de partículas isoladas do vírus da dengue tipo 1 (DENV-1), tipo 2 (DENV-2) e tipo 3 (DENV-3) sobre a superfície de GML depositada sobre silício modificado com o amino terminal.

O vírus da dengue possui um capsídeo composto por três proteínas estruturais, incluindo a glicoproteína E, responsável pela ligação do vírus às células hospedeiras através do reconhecimento de anticorpos específicos (KUNO *et al.*, 1990). Além disso, estudos demonstraram que a presença de unidades de manose é importante para a ligação da proteína E, durante o processo de entrada do vírus nas células (HUNG *et al.*, 1999).

Os valores de elipsometria para os vírus DENV-1 e DENV-3 adsorvidos nos filmes de GML forneceram uma espessura média de $1,7 \pm 0,6$ e $0,8 \pm 0,5$ nm (FIGURA 39), respectivamente. O DENV-2 apresentou uma adsorção de $3,7 \text{ nm} \pm 1,15 \text{ nm}$, sendo, portanto, a maior adsorção dos três tipos de vírus. As adsorções de partículas de dengue em filmes de GML devem estar sendo mediadas pelas ligações de H entre os resíduos polares da proteína E e a superfície composta por grupos hidroxilas presentes na cadeia do polissacarídeo. Como os sorotipos do vírus da dengue diferenciam na composição da proteína E, as diferenças dos valores de espessura podem ser correlacionadas aos diferentes sorotipos.

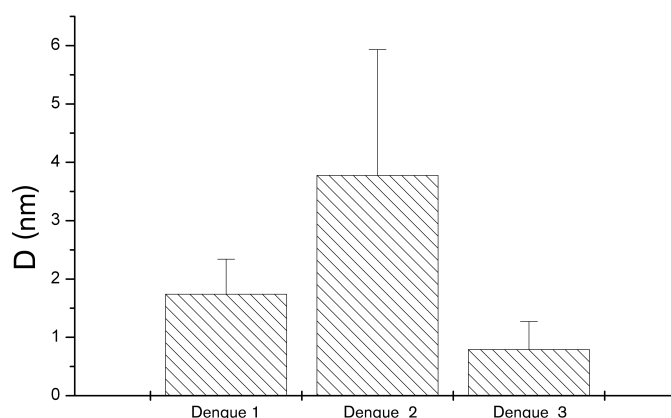


FIGURA 39 – VALORES DE ESPESSURAS MÉDIA (D), EM nm, DETERMINADOS POR ELIPSOMETRIA PARA OS VÍRUS DA DENGUE (DENV-1, 2 E 3) ADSORVIDOS SOBRE OS FILMES DE GML

FONTE: O Autor (2011)

As leituras de elipsometria foram calculadas ao obter a média dos valores medidos em diferentes áreas dos filmes, demonstrando que o vírus da dengue não recobriu de forma homogênea a superfície, sendo inclusive esse fator o responsável pelo alto desvio padrão (FIGURA 39).

A imagem de topografia de AFM (FIGURA 40) obtida para o DENV-2 adsorvido sobre filme de GML, com o correspondente corte transversal, confirmou os resultados acima descritos.

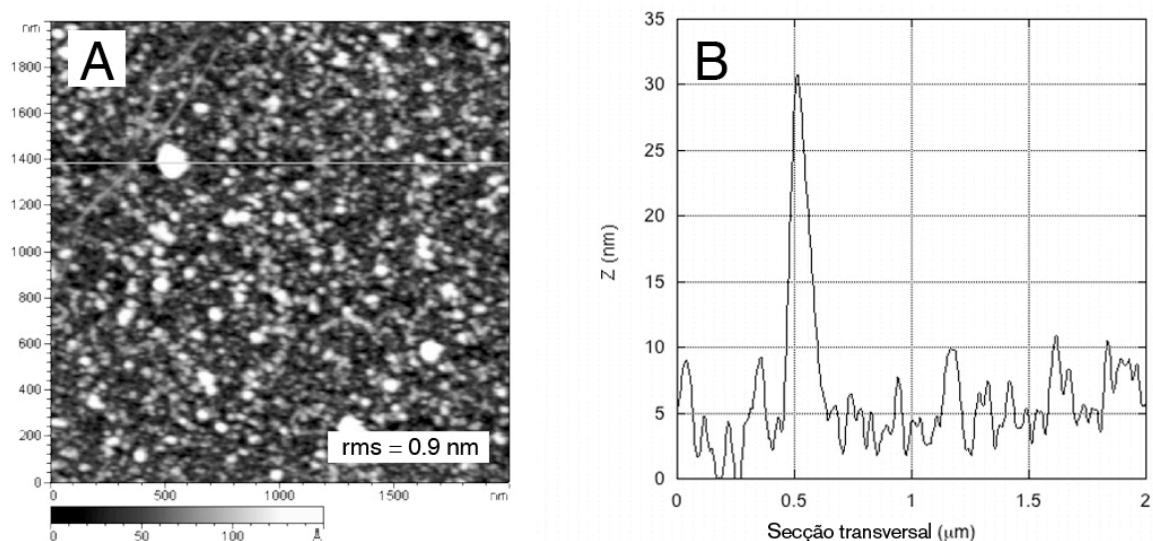


FIGURA 40: IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DE VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DA GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

Já foi inicialmente demonstrado por microscopia de transmissão (LINDENBACH; RICE, 2005) que o DENV-2 apresenta dois tipos de diâmetros, uma partícula de 50 nm correspondente a um núcleo denso de 30 nm e o envelope lipídico; e uma partícula de 14 nm correspondente ao vírus e a partícula de hemaglutinina de sedimentação (SHA). As dispersões de vírus da dengue usadas para os experimentos de adsorção continham partículas de DENV secretadas pelos vírus e proteínas adicionais usadas no meio de cultura. A presença de entidades esféricas pode ser observada por imagens de AFM, com aproximadamente 27,3 nm, cujo tamanho pode ser correlacionado com o núcleo do vírus, já que o envelope lipídico pode ter rompido durante o procedimento de secagem. Todos esses dados estão de acordo com os resultados apresentados por Pereira *et al.* (2008), no qual uma mistura de xiloglucana e alginato de sódio foi usada como filme suporte para o vírus da dengue.

Ensaio de dessorção também foram realizados. Nesses, as placas funcionalizadas foram colocadas em contato com água destilada, por mais 24 horas, removidas, secas e analisadas novamente por elipsometria. E negligenciáveis mudanças foram observadas, indicando adsorção irreversível dos vírus da dengue.

A adsorção do vírus DENV-2 também foi analisada por espectrometria de XPS (FIGURA 41). O filme DENV-2 adsorvido sobre a GML-amino terminal apresentou a proporção C:N de nitrogênio de 10,9% enquanto a proporção dos átomos de carbono foi de 89,1%. As ligações envolvidas estão descritas nas TABELAS 12 e 13.

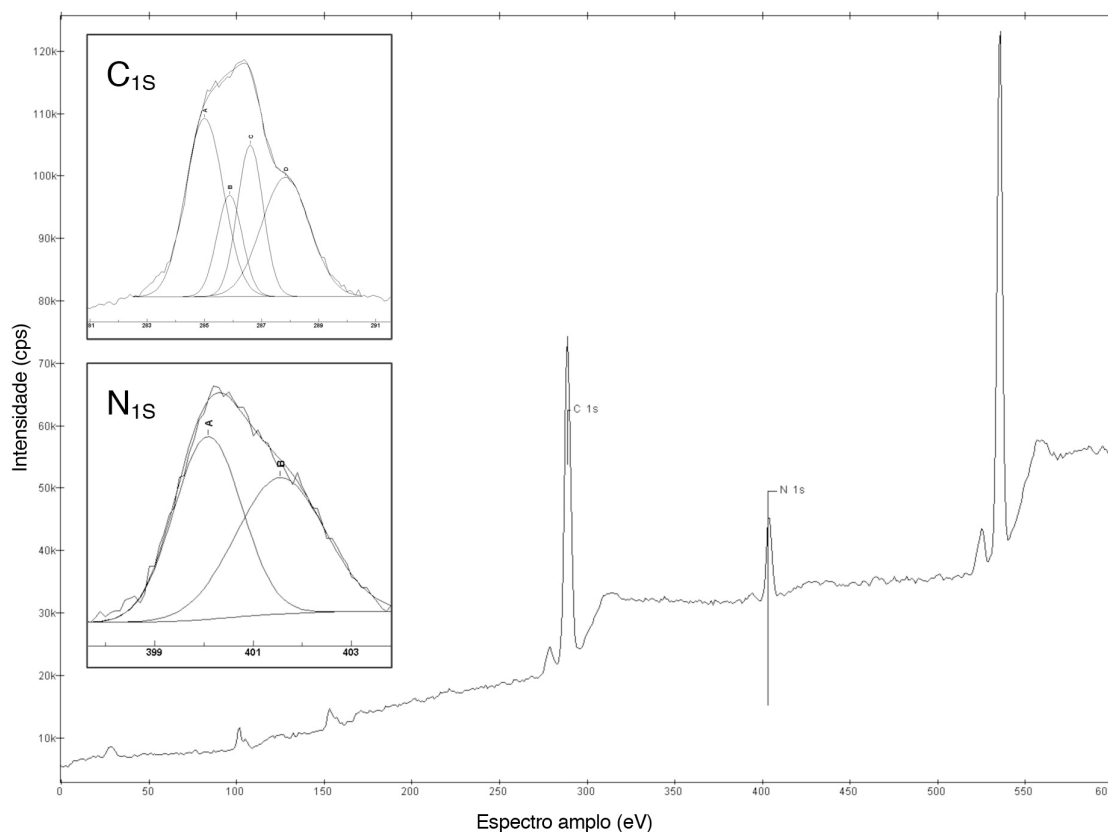


FIGURA 41: AMPLO ESPECTRO DE XPS OBTIDO PARA A ADSORÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML) ADSORVIDA SOBRE SILÍCIO – APS, COM A DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE C_{1s} E N_{1s}
 FONTE: O Autor (2011)

Os resultados apresentados nas TABELAS 12 e 13 referentes à quantificação de C_{1s} e N_{1s} mostraram os dados que foram obtidos da deconvolução dos espectros. O espectro de C_{1s} apresentou quatro tipos de energias de ligação, assim como nos filmes contendo ALB ou ConA, uma a mais do que na amostra contendo apenas GML. Pode-se observar duas energias de ligação (285,0 e 286,6 eV) que envolveram apenas átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. As ligações em 285,8 e em 287,4 eV correspondem a ligações do tipo amina e amida respectivamente.

Na deconvolução do espectro N_{1s} , dois tipos de ligações foram observados, uma em 400,8 eV (amida) e uma em 401,5 eV (amina). Diferentes dos filmes de ALB e ConA, o espectro para o vírus apresentou uma proporção próxima entre os dois tipos de ligações envolvendo o nitrogênio. Essa diferença deve ser proveniente da

composição das proteínas pois o vírus da dengue apresenta em seu capsídeo a presença da proteína E, que pode apresentar diferença na composição das ligações em que envolvem os átomos de carbono e nitrogênio.

TABELA 12: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO C_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DO VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)

Função química C _{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Alquil	C-C e C-H	285,0	35,7
Amina	C-N	285,8	13,5
Álcool	C-O	286,6	20,5
Amida	O=C-N	287,4	30,3

FONTE: O Autor (2011)

TABELA 13: DADOS OBTIDOS PARA ENERGIA DE LIGAÇÃO N_{1s} EM ANÁLISES DE XPS PARA O FILME DO VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GALACTOMANANA DE LEUCENA (GML)

Função química N _{1s}	Ligação	Energia de ligação (eV)	Porcentagem (%)
Amida	O=C-N	400,8	50,5
Amina	C-N	401,5	49,5

FONTE: O Autor (2011)

Portanto essas análises e interpretações, em que se pode observar ligações típicas de carboidratos e de proteínas na superfície do filme, comprovaram a adsorção do vírus DENV-2 sobre a camada de GML- silício amino terminal, complementando os resultados obtidos pela elipsometria e por AFM.

4.4.2.3 Interação dos filmes de galctomanana – Concanavalina A com vírus da dengue

Tassaneetrithep *et al.* (2003) e Navarro-Sanchez *et al.* (2003) mostraram que o mosquito vetor do vírus da dengue interage com a lectina para entrar eficientemente nas células. Como todas as flavoviroses (viroeses decorrentes de infecção por vírus da família Flaviviridae), o vírus da dengue precisa de uma etapa

para replicação no artrópode vetor antes de ser transmitido aos humanos (REY, 2003). Em uma infecção natural, o vírus é depositado na pele pelo mosquito infectado. As células dendríticas da pele possuem uma lectina específica para a manose dos carboidratos presentes nos vírions produzidos nas células infectadas do inseto. Por tudo isso, os filmes de monocamadas de GML-ConA foram testados para observar a influência que a ConA, previamente adsorvida no filme de polissacarídeo, teria sobre a adsorção do vírus.

O sorotipo DENV-2 foi escolhido para essa imobilização por duas razões: primeira, estudos mostraram que há uma maior probabilidade de ocorrência de sintomas mais severos em infecções secundárias com DENV-2 do que com outros sorotipos (VAUGHN *et al.*, 2000) e segunda, os filmes mais espessos na GML foram obtidos para esse sorotipo. As partículas virais adsorveram no filme contendo ConA com espessura média, medida por elipsometria, de $4,7 \text{ nm} \pm 1,3$. Esse resultado foi maior do que o observado para as superfícies contendo apenas GML, o que indicou que a presença da lectina influencia a adsorção dos vírus nos filmes. Apesar dos dados elipsométricos não diferirem muito, a imagem de topografia de AFM (FIGURA 42) mostrou a diferença na superfície do filme.

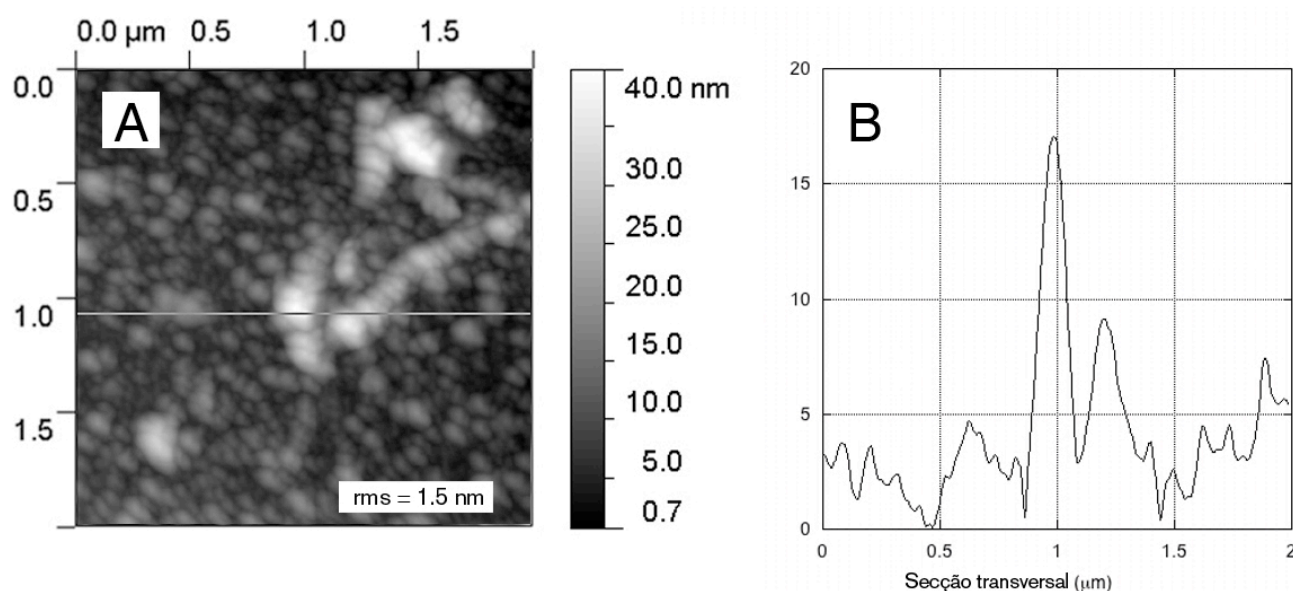


FIGURA 42: IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA ($2 \times 2 \mu\text{m}$) DE VÍRUS DA DENGUE (DENV-2) IMOBILIZADO SOBRE O FILME DE GML-ConA (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)
 FONTE: O Autor (2011)

Além do aumento no número de partículas esféricas, houve um aumento na rugosidade de $0,9 \pm 0,1$ nm para $1,5 \pm 0,1$ nm, indicando um maior número de moléculas adsorvidas. O corte transversal correspondente da AFM, mostrou partículas arranjadas entre o filme de proteína-carboidrato com tamanhos superiores a 15 nm. Como não se pode distinguir o tipo de partícula, pode-se concluir que essas correspondem provavelmente às partículas de SHA, secretadas pelos vírus da dengue, e que possuem diâmetro de 14 nm.

Como a ConA liga-se especificamente a manose, a adesão de partículas virais no filme de GML-ConA foram avaliadas com a presença de 50 mMol/L de manose. A espessura média de $2,7 \text{ nm} \pm 1,4$ mostrou que a presença de manose diminui a adsorção do vírus em até 50%, sugerindo que a manose livre compete com o filme de GML-ConA para a ligação com o vírus. Pode-se sugerir que quando a lectina está ligada a manose, a proteína E não consegue reconhecer os sítios de ligação da lectina no filme de GML, e a adsorção viral é diminuída. Apesar de estar reduzida, alguns vírus ainda aderem, o que pode ser relatado ao reconhecimento do vírus a manose exposta presente na cadeia de GML, diferenciando do trabalho em que se usou xiloglucana (PEREIRA *et al.*, 2008), CMC (CASTRO; KAPPL; PETRI, 2005) e superfícies sólidas (PEREIRA *et al.*, 2010) que demonstraram que a adsorção do vírus diminuiu consideravelmente, devido a ausência de manose na cadeia principal dos polímeros que foram utilizados.

A FIGURA 43 mostra um resumo dos resultados obtidos para os filmes monocamadas que foram desenvolvidos. Inicialmente, o biopolímero GML foi adsorvido sobre o substrato de silício amino-terminal. Então, sobre esse foram testadas a adsorção de duas proteínas, ALB e ConA. A ALB (FIGURA 43A) formou um filme mais espesso em pH 5.5, provavelmente por haver interações do tipo íon-dipolo carboidrato com as aminas terminais da proteína. A lectina foi capaz de adsorver (FIGURA 43B) explorando a capacidade de ligar as unidades de manose. Não apenas lectinas foram testadas, como também diferentes sorotipos do vírus da dengue foram adsorvidos em filmes de GML (FIGURA 43C). Ambos, vírus e lectinas, foram testados no mesmo substrato GML (FIGURA 43D) sugerindo uma aplicação em sensores de carboidratos.

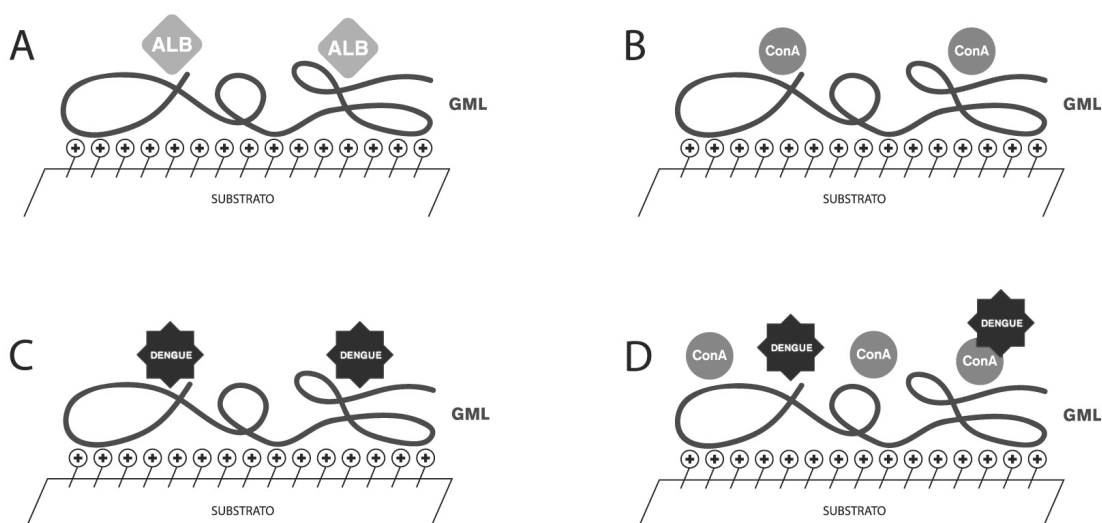


FIGURA 43 – DESENHO ESQUEMÁTICO RESUMINDO A FORMAÇÃO DOS FILMES EM MONOCAMADA DE GML SOBRE APS-Si. EM (A), A DEPOSIÇÃO DE ALB SOBRE O FILME DE GML-APS, EM (B) A DEPOSIÇÃO DA ConA SOBRE O FILME DE GML-APS, EM (C) A DEPOSIÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE SOBRE O FILME DE GML-APS E EM (D) A DEPOSIÇÃO SIMULTÂNEA DO VÍRUS DA DENGUE E DA PROTEÍNA ConA SOBRE O FILME DE GML-APS

FONTE: O Autor (2011)

E finalmente, a FIGURA 44 complementa os resultados demonstrando esquematicamente os filmes adsorvidos com suas respectivas espessuras. Esses resultados foram significativos já que a dengue é a mais importante doença viral transmitida por um mosquito e a febre causada pela dengue representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, especialmente nas áreas tropicais. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) estima em mais de 100 países que aproximadamente 50 milhões de pessoas se infectam a cada ano por esse vírus. Como a dengue é uma doença muito importante, maiores informações com relação à ligação do vírus durante o processo de infecção na célula hospedeira são necessárias para desenvolvimento de técnicas destinadas a investigação de diagnóstico dessa doença.

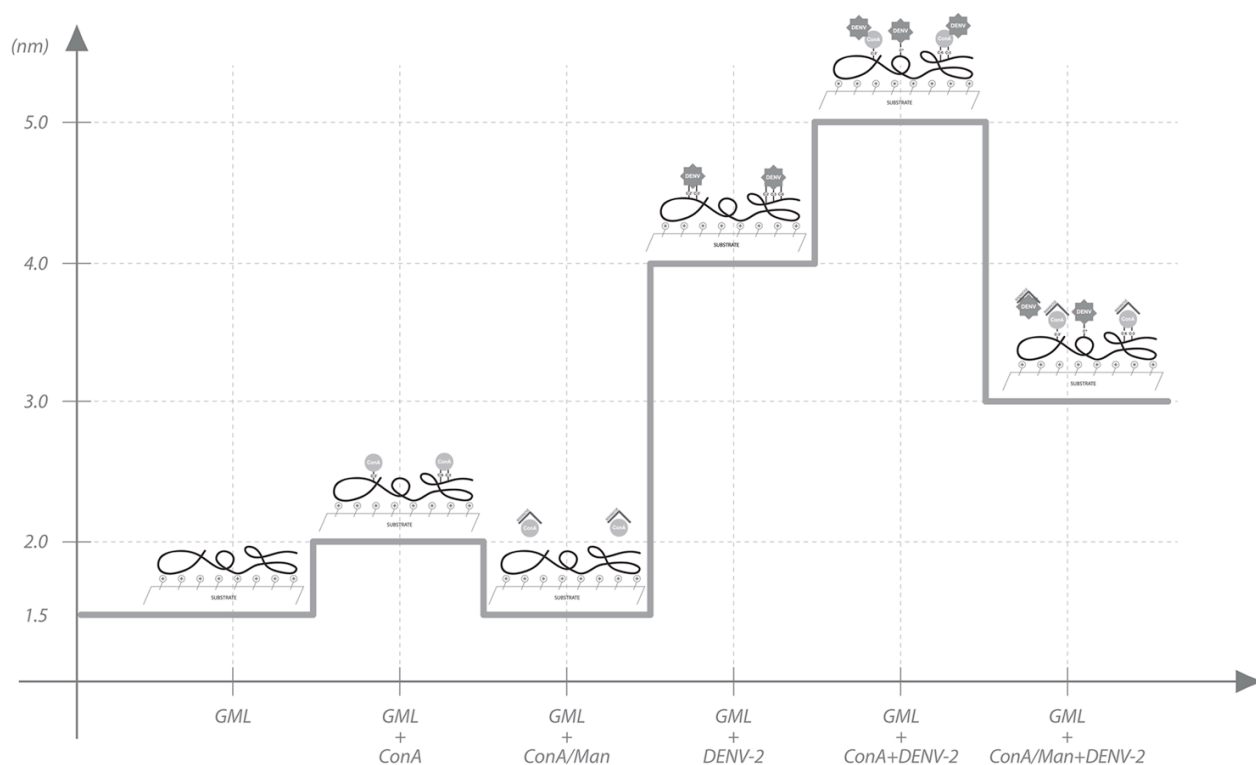


FIGURA 44 – DESENHO ESQUEMÁTICO RESUMINDO E DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DOS FILMES EM MONOCAMADA DE GML SOBRE APS-Si COM SUAS RESPECTIVAS ESPESSURAS

FONTE: O Autor (2011)

4.4.3 Desenvolvimento de filmes multicamadas

A formação de filmes em multicamadas foi desenvolvida utilizando a técnica *layer-by-layer* (LBL). A sequencial deposição de policações e poliânions em superfícies sólidas tem sido muito empregada em diversas áreas. Esses produtos finais formados são comumente chamados de filmes de multicamadas de polieletrólitos, ou em inglês *polyelectrolyte multilayers* (PEM) (DECHER, 1997).

Nesse trabalho, foi explorada a técnica LBL através de diferentes metodologias de deposição: imersão, *spray*, *spin coating* e acompanhamento de crescimento por monitoramento da dissipação em microbalança de cristal de quartzo (QCM-D). Como essa técnica tem como base a atração das moléculas através de cargas opostas, diferentes sistemas de biopolímeros aniônicos e catiônicos foram escolhidos para o estudo.

Como polímero aniônico foi explorada a aplicação da mistura GML-AL. A quitosana (CHI), o polipeptídeo poli-L-lisina (PLL) e o polímero poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) foram usados como polímeros catiônicos. Os valores de pKa de cada um deles estão listados na TABELA 14.

TABELA 14 – DADOS DE pKa PARA OS POLÍMEROS ALGINATO, POLI(ALILAMINA HIDROCLORADA), POLI-L-LISINA (PLL) E QUITOSANA

Amostras	pKa
Alginato de sódio	3,38 (ácido manurônico) ^a
	3,65 (ácido gulurônico) ^a
poli(alilamina hidrocloreada)	8,5 ^b
poli-L-lisina	10.68 ^c
Quitosana	6.5 ^d

^aHAUG (1961)

^bITANO; CHOI; RUBNER (2005)

^cBRANT; FLORY (1965)

^dANTHONSEN; SMIDSRØD (1995)

FONTE: O Autor (2011)

4.4.3.1 Análises por microscopia de fluorescência da galactomanana e alginato em solução e em filmes multicamadas da mistura galactomanana-alginato

Há relatos da adsorção do alginato de sódio para formação de filmes LBL (MARTINS *et al.*, 2010; MAURSTAD *et al.*, 2008; MJAHEED *et al.*, 2009) já que esse é carregado negativamente entretanto, não existem relatos de filmes LBL formados utilizando a GML. Como a GML não é carregada, a solução de lavagem poderia estar removendo-a do sistema, logo após a sua deposição. Assim, antes de iniciar o estudo da formação dos filmes multicamadas, os dois polissacarídeos foram marcados com as suas respectivas sondas fluorescentes para acompanhar o processo de deposição dos filmes.

As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas em filmes multicamadas da mistura GML-AL como poliânion.

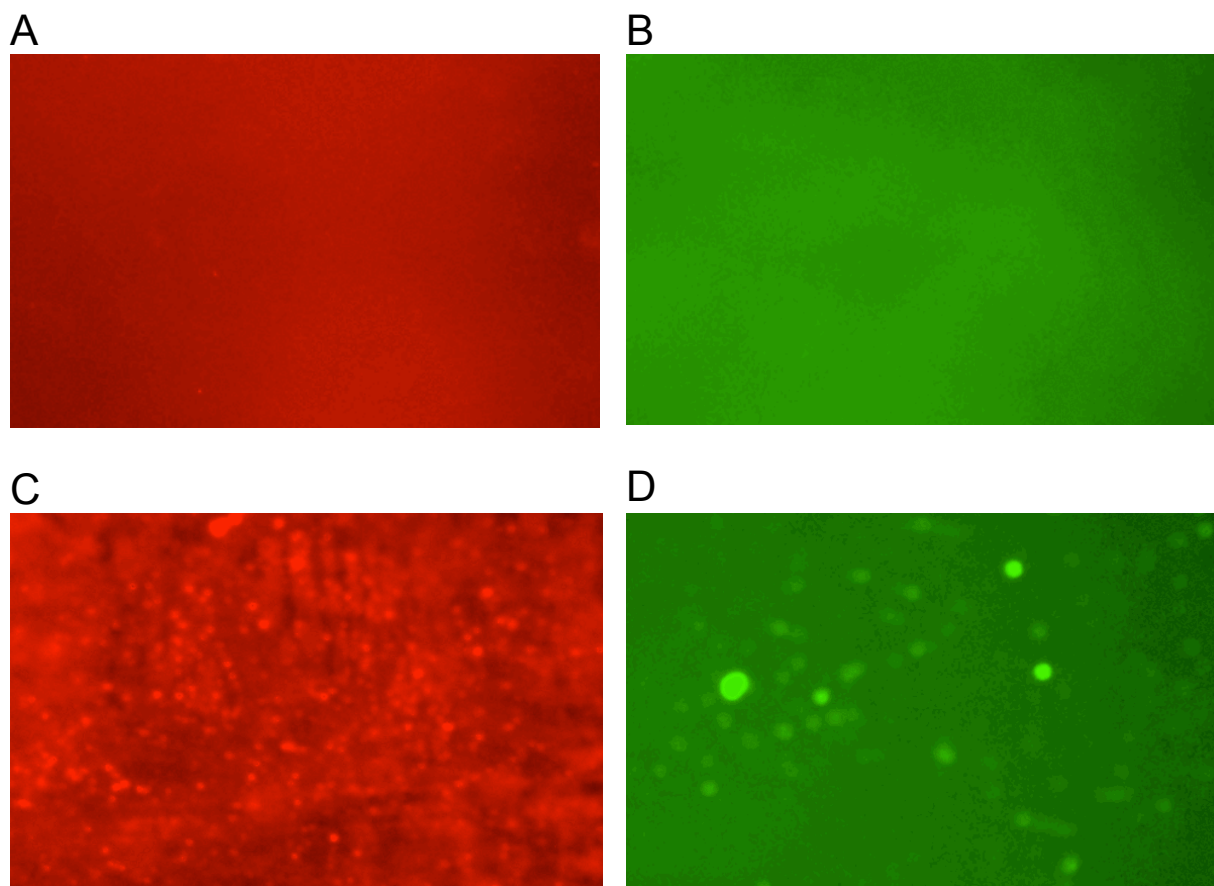


FIGURA 45 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA (AUMENTO DE 200x) EM QUE SE MARCOU A GALACTOMANANANA (GML) COM RODAMINA (RO) E O ALGINATO (AL) COM FLUORESCÉINA (FL). (A) SOLUÇÃO DE GML-RO; (B) SOLUÇÃO DE AL-FL; (C) FILME COM 10 CAMADAS DA MISTURA GML-AL/PAH, CONTENDO A GML MARCADA COM RO E (D) FILME COM 10 CAMADAS DA MISTURA GML-AL/PAH, CONTENDO O AL MARCADO COM FL

FONTE: O autor (2011)

A FIGURA 45 mostra as imagens obtidas em microscopia de fluorescência para os filmes LBL. Nas FIGURAS 45A e 45C marcou-se a GML com rodamina (GML-RO) e nas FIGURAS 45B e 45D, marcou-se o AL com fluoresceína (AL-FL). As FIGURAS 45A e 45B mostram imagens apenas das soluções de GML-RO ou AL-FL, observando-se que os dois polissacarídeos foram marcados. A partir dessas soluções fluorescentes, os filmes multicamadas foram confeccionados utilizando ora um, ora outro polissacarídeo marcado na mistura GML-AL. Mesmo após o processo de lavagem, tanto a GML-RO quanto o AL-FL permaneceram no filme a cada nova deposição. Inclusive pode-se observar que além dos polímeros recobrirem a superfície da lâmina, houve também a presença de partículas que podem ser decorrentes da ligação entre o AL e os íons Ca^{2+} . A presença de partículas nos

filmes em que o AL está marcado pode ser devido à ligação cruzada que o AL faz com íons cálcio. Essas ligações cruzadas formando partículas foram também demonstradas anteriormente no trabalho de Valenga (2007). Mas, como mostram as imagens, nos filmes em que apenas a GML está marcada, houve também a presença de partículas, mostrando que as cadeias dos polissacarídeos em sinergia podem estar interagindo de uma maneira que faz com que a GML também participe da formação de partículas com os íons cálcio.

Esses resultados de fluorescência são especialmente importantes para dar a continuidade à aplicação das misturas de GML-AL como polieletrólitos e formação de filmes.

4.4.3.2 Filmes multicamadas de galactomanana-alginato/ poli(alilamina hidroclorada)

Inicialmente, o sistema testado para formar filme LBL foi a mistura GML-AL como poliânion e a poli(alilamina hidroclorada) (PAH) como policátion. A PAH foi o primeiro polímero catiônico testado por Decher, Hong e Schimtt (1992) e, desde então, por ter sua empregabilidade muito explorada, tornou-se o policátion mais estudado pela técnica de LBL, com suas propriedades bem caracterizadas.

Diferentes técnicas de LBL foram testadas para as adsorções. Os resultados obtidos com o crescimento dos filmes pelos métodos de imersão, *spin-coating* e *spray* são apresentados na FIGURA 46.

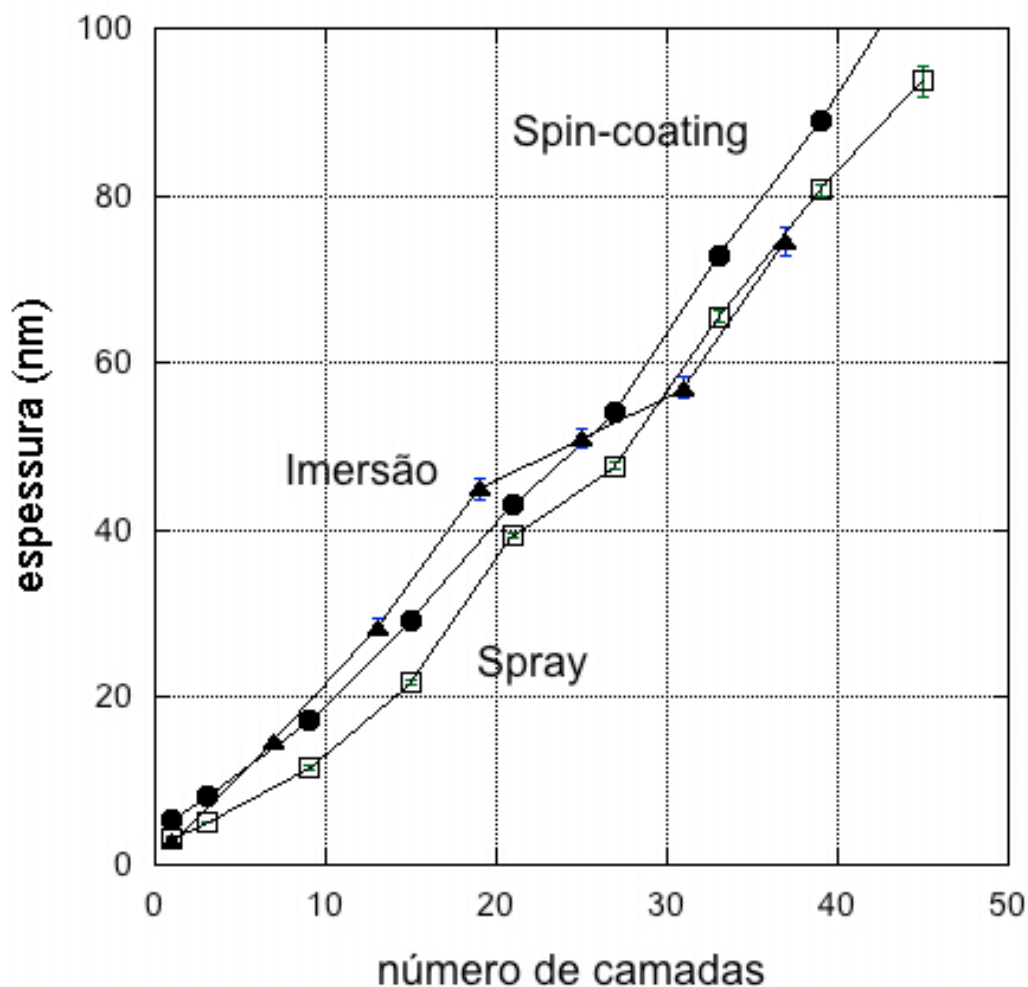


FIGURA 46 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPESSURA DOS FILMES OBTIDOS PELA TÉCNICA LBL, COMPOSTOS PELA MISTURA GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH), APLICANDO OS MÉTODOS DE IMERSÃO (▲), DE SPRAY (□) E SPIN-COATING (●)
 FONTE: O Autor (2011)

Nas três metodologias de deposição dos polímeros os valores de espessuras de filmes obtidos foram semelhantes com 30 camadas depositadas, apresentando espessura de aproximadamente 60 nm. O crescimento dos filmes ocorreu de uma forma linear a cada nova camada adicionada, como observado no sistema mais estudado contendo PAH, que é o sistema PSS, poli(estireno sulfonato)/PAH (LADAM *et al.*, 2000; CARUSO *et al.*, 1999b; PICART *et al.*, 2001a).

Esse crescimento é explicado por esses filmes apresentarem uma estrutura estratificada, na qual cada camada de polieletrólito interpenetra apenas nas camadas vizinhas onde foi adsorvido, principalmente por interações eletrostáticas entre os polissacarídeos da solução com os polieletrólitos de cargas opostas que

estão formando a camada mais externa no filme (RICHERT *et al.*, 2004c). Cada novo polieletrólito depositado possui um excesso das cargas opostas que irão pairar e inverter o potencial zeta da camada mais externa do filme em crescimento. O excesso de cargas é o responsável por limitar a quantidade de material que será adsorvido por causa da repulsão do material excedente, promovendo o crescimento do filme (LADAM *et al.*, 2000). Apesar de haver interpenetração entre as camadas vizinhas, as camadas que estão mais distantes entre si, não estabelecem nenhum tipo de “comunicação” (HÜBSCH *et al.*, 2004).

Os filmes depositados em substrato apresentaram espessura em escala nano e, portanto, não são percebidos visualmente quando se está no início da deposição dos polieletrólitos. Uma maneira de saber que estavam crescendo e ficando mais espessos, com o aumento da deposição de camadas, foi observar se houve alteração de coloração do substrato. Essa alteração visual macroscópica começou a ser percebida após a adição de algumas camadas, em que o substrato começou a ter uma coloração azul, seguida de coloração rósea com o aumento de adsorções (acima de 40 camadas) (FIGURA 47).

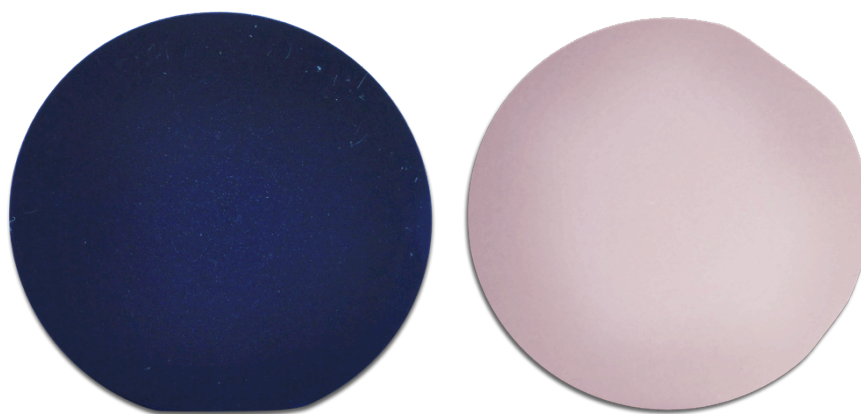


FIGURA 47 – EXEMPLO DE MUDANÇA DE COLORAÇÃO DO SUBSTRATO SILÍCIO CONFORME A DEPOSIÇÃO DE CAMADAS DO SISTEMA GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH)
FONTE: O Autor (2011)

As imagens de AFM foram feitas para os filmes LBL a fim de observar-se como seriam as superfícies obtidas. Para a análise foram usados filmes, contendo 40 camadas de polieletrólitos, formados pelas diferentes deposições, com uma

espessura entre 80 a 90 nm (medida por elipsometria) (FIGURAS 48, 49 e 50), e com a camada de PAH finalizando os filmes.

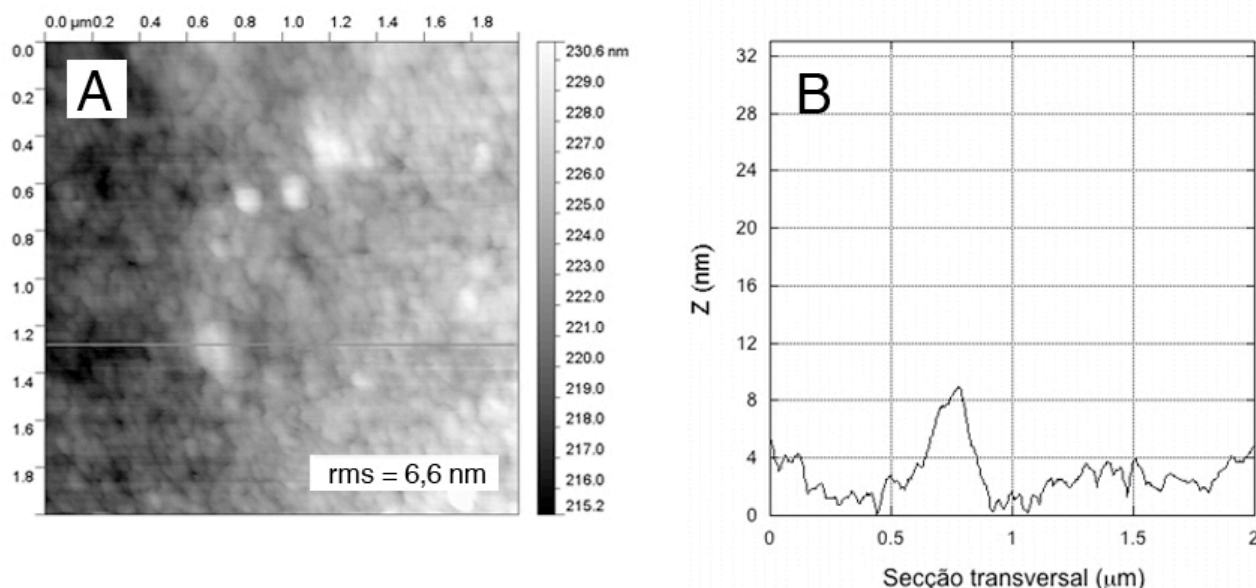


FIGURA 48 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE *SPIN-COATING* (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

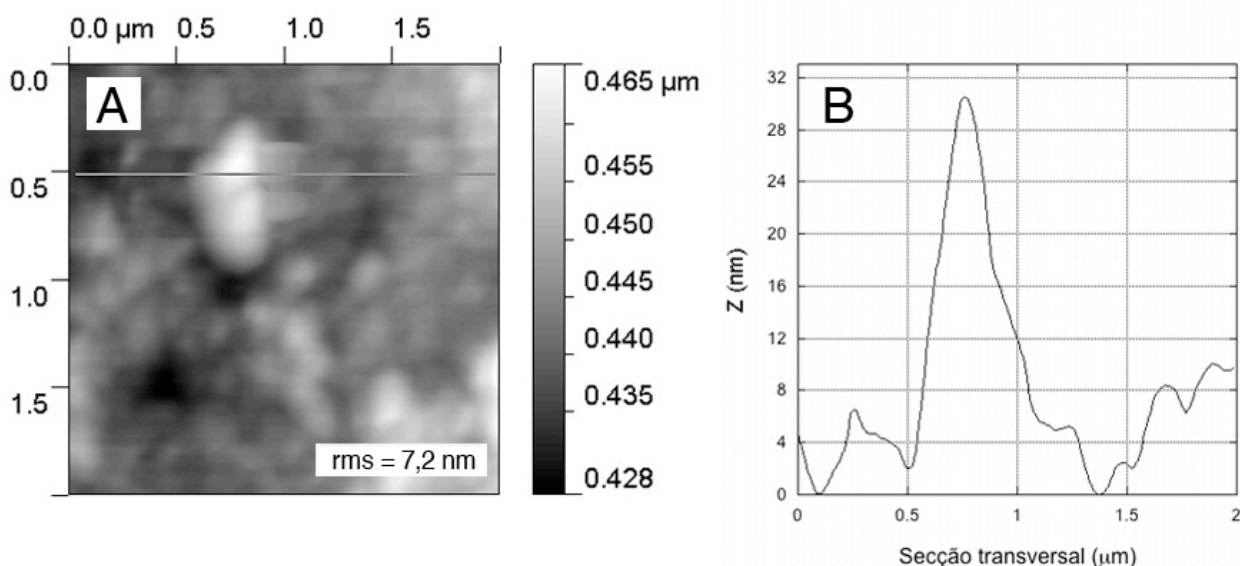


FIGURA 49 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE IMERSÃO (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

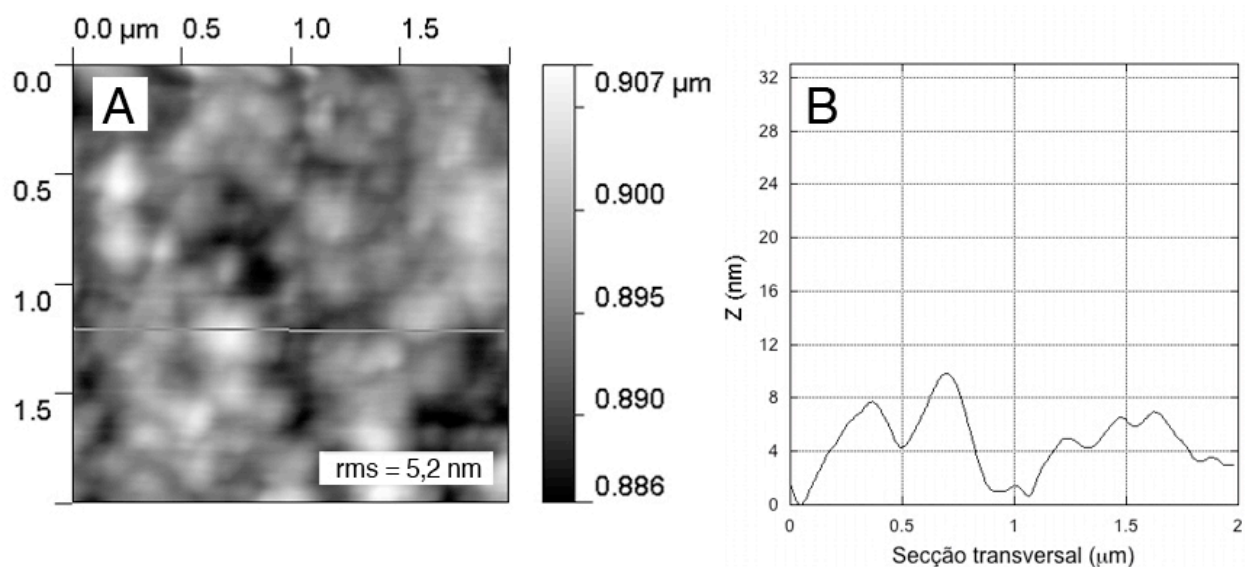


FIGURA 50 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E PÓLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE *SPRAY* (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

As imagens de topografia (FIGURAS 48A, 49A e 50A) com os respectivos cortes transversais mostram que os filmes crescidos por *spray*, *spin-coating* e imersão, apresentaram valores de rms da rugosidade da área (raíz quadrada média, expressão do inglês, *root mean square*) de respectivamente, 5,2, 6,6 e 7,2 nm.

Esses resultados estão de acordo com resultados os descritos na literatura, em que filmes de PAH obtidos por deposição de *spray* foram menos rugosos do que aqueles obtidos por imersão (SCHLENOFF; DUBAS; FARHAT, 2000). Outra característica observada é a formação de “ilhas”, sendo que, para as amostras obtidas por imersão e *spray* essas ilhas coalescem e tornaram-se maiores. A formação de ilhas é proporcional a quantidade de camadas adsorvidas no substrato (RICHERT *et al.*, 2004c).

Os crescimentos dos filmes foram acompanhados através da técnica de QCM-D, para complemento de informações estruturais. A QCM-D é uma técnica *in situ*, sensível em que se observa a adsorção das camadas em tempo real, em meio líquido, onde alterações de massa são detectadas pela oscilação do cristal de quartzo.

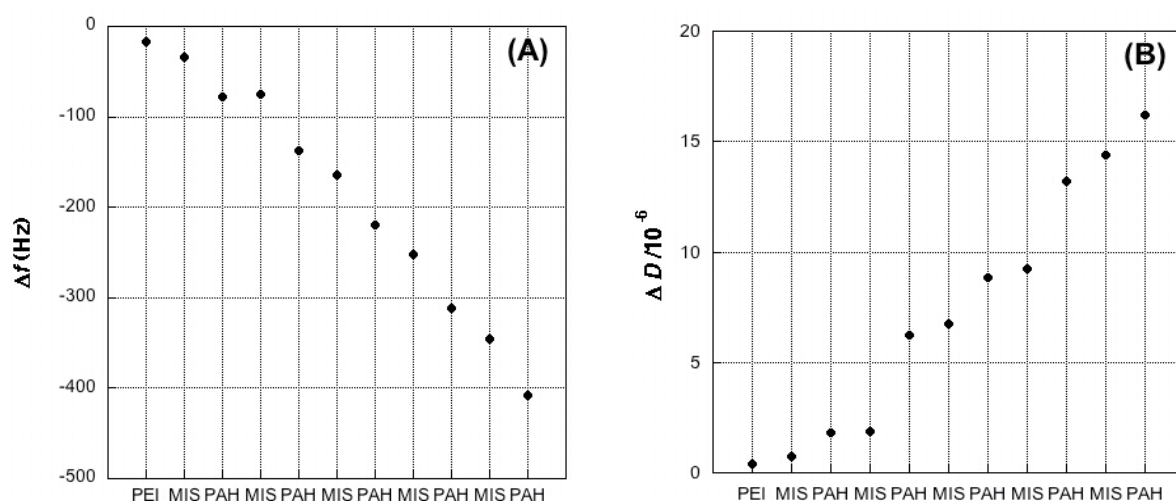


FIGURA 51 - DESLOCAMENTO DE FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA EM (A) E DISSIPACÃO EM (B) EM FUNÇÃO DAS CAMADAS DEPOSITADAS DO FILME LBL DE GALACTOMANANA - ALGINATO E POLI(ALIALAMINA HIDROCLORADA) (GML-AL/PAH) ADSORVIDO SOBRE CRISTAL DE OURO, E MEDIDOS POR QCM-D. DADOS REFERENTES À FREQUÊNCIA DE 25 Hz

FONTE: O Autor (2011)

A FIGURA 51 mostra os deslocamentos da frequência e da dissipação medidos, a cada nova deposição de uma camada. A análise foi feita em mais de uma frequência de ressonância, porém, para simplificar os resultados, foram mostrados os dados de QCM-D apenas para a terceira frequência harmônica (25 Hz). De acordo com uma padronização convencional, a frequência foi normalizada pelo número da vibração de ressonância (FEILER *et al.*, 2007). A ressonância de frequência do cristal em contato com o solvente NaCl 10 mM/L foi usada como valor de referência, sendo que $\Delta f = 0$, antes da deposição da primeira camada. Sempre para a primeira camada depositada foi utilizado o polímero PEI, para induzir o crescimento dos filmes. O decaimento da frequência (FIGURA 51A) aumentou concomitante ao aumento da dissipação (FIGURA 51B), indicando que houve adição de massa no cristal a cada nova camada. Esses deslocamentos mostraram que a deposição dos filmes foi irreversível, porque mesmo após o procedimento de lavagem, a massa depositada não desorveu.

O decaimento da frequência decresceu quase de forma linear e regular, provavelmente porque os filmes foram sendo formados homogeneamente sobre o cristal. O deslocamento da dissipação fornece informações sobre a rigidez de um filme e, quanto maior o valor de dissipação, menos rígido é um filme. No início da

dissipação, não houve alterações significativas da dissipação. Isso ocorreu porque provavelmente no início da construção, o filme sofreu a influência da presença do substrato, sobre os quais os polieletrólitos interagiram mais fortemente do que com os polieletrólitos adsorvidos por último, durante o processo de deposição, formando uma estrutura ainda rígida. Entretanto, com o aumento da deposição de camadas, os deslocamentos passaram a ser mais pronunciados, indicando a formação filmes relativamente hidratados e viscoelásticos. Essa característica viscoelástica excluiu a utilização da equação de Sauerbrey (BALL *et al.*, 2005) que avalia quantitativamente a massa de polieletrólitos depositada por unidade de área, já que essa só pode ser aplicada em sistemas rígidos.

4.4.3.3 Filmes multicamadas de galactomanana e alginato / poli-L-lisina

A mistura GML-AL foi testada também em filmes LBL tendo como polycation a poli-L-lisina (PLL). A PLL é um homopolímero constituído pelo aminoácido L-lisina, carregado positivamente, amplamente usado em engenharia de tecidos, por ser biocompatível (MARUYAMA *et al.*, 1999), e por ser facilmente conjugada com moléculas bioativas (MÉZO *et al.*, 2000).

As mesmas técnicas testadas para o polímero sintético PAH foram empregadas para a PLL. A FIGURA 52 compara o crescimento dos filmes pelos métodos de imersão, *spin-coating* e *spray*.

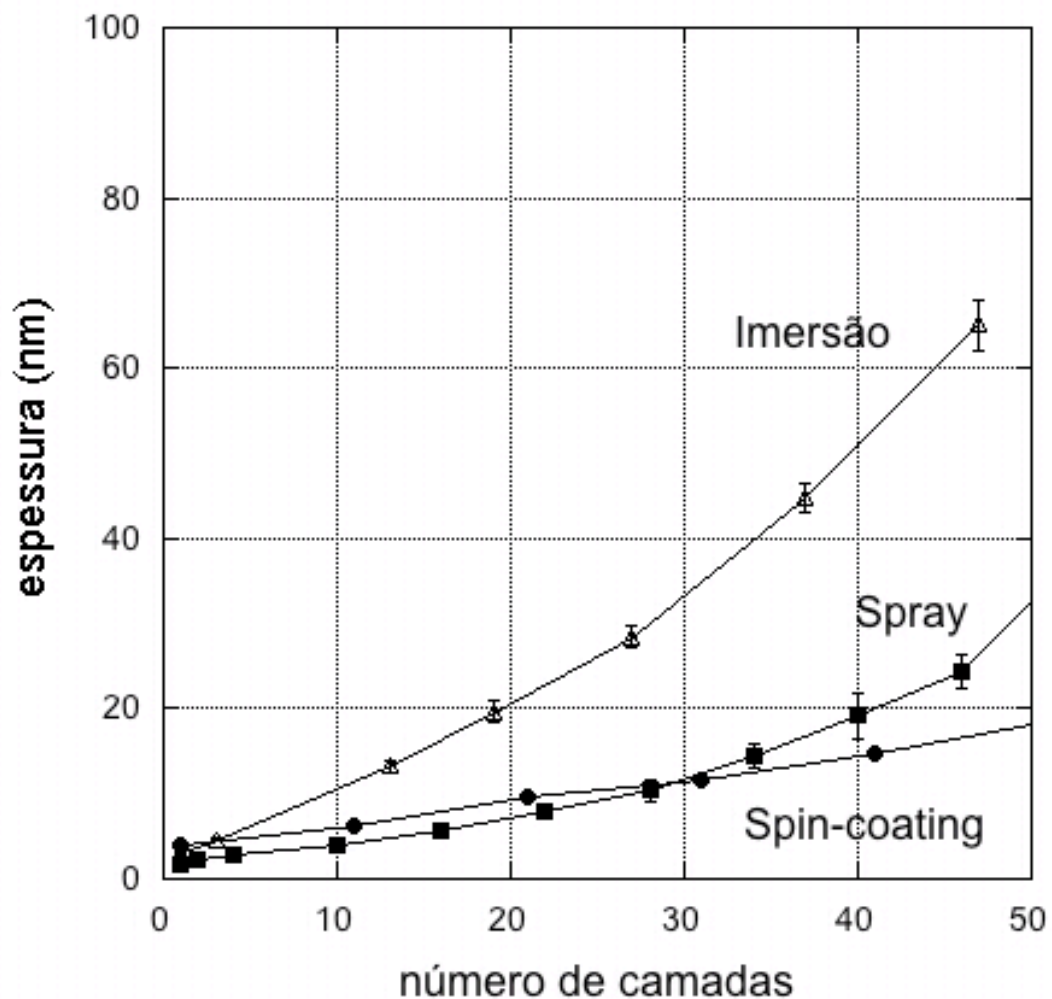


FIGURA 52 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPESSURA DOS FILMES OBTIDOS PELA TÉCNICA LBL, COMPOSTOS PELA MISTURA GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL), APLICANDO OS MÉTODOS DE IMERSÃO (▲), DE SPRAY (◻) E SPIN-COATING (●)
 FONTE: O Autor (2011)

Pela técnica de *spin-coating* foram obtidos filmes mais finos. O *spin-coating* formou filmes de aproximadamente 14 nm, com 40 camadas depositadas enquanto que o *spray* formou filmes de 20 nm e por imersão de 52 nm. Pelo método de *spray*, mais camadas de polieletrólitos foram depositados para que filmes atingissem espessura maior de 20 nm. Esse é o comportamento usual esperado para os filmes LBL. Cada deposição é feita ao colocar o substrato em contato com os polieletrólitos. No método de imersão, esse tempo é maior, facilitando a organização e difusão das cadeias de polissacarídeos por toda a superfície para adsorverem e formarem um filme homogêneo (IZQUIERDO *et al.*, 2005). Enquanto que pela técnica de *spray* as moléculas são vaporizadas por apenas poucos segundos no

substrato disposto na vertical. Não há o acúmulo de solução sobre o substrato, já que o excesso é drenado pela ação da força da gravidade, restando apenas uma fina camada de líquido. Com isso, há menor quantidade de moléculas em contato com o silício e que, conseqüentemente, formarão filmes mais finos. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao método de *spin-coating*, sendo que a força atuante é a força centrífuga que, além de drenar líquido para fora, muitas vezes acaba por secar todo o substrato, influenciando na formação de filmes menos espessos.

O filme formado por *spin-coating* apresentou um crescimento linear, diferente do crescimento dos filmes por *spray* e por imersão. O filme por imersão apresentou um crescimento exponencial e o filme por *spray* inicialmente apresentou crescimento lento e exponencial, seguido de um crescimento linear a partir de 30 camadas. O comportamento de crescimento exponencial era esperado já que filmes de alginato/PLL, depositados por imersão, relatados anteriormente por Elbert, Herbert e Hubbell (1999), se apresentaram dessa maneira.

A responsável para esse crescimento exponencial é a difusão da última camada de polieletrólito através das multicamadas do filme, a difusão *in* e *out* (PICART *et al.*, 2002). Em sistemas de hialuronana (HA)/PLL, o HA interagia apenas com a camada mais externa do filme durante cada deposição, enquanto que a PLL, difundia para dentro e para fora de toda a estrutura do filme. Assim, a presença do HA deixa a última camada do filme com cargas negativas, que entrará em contato com a PLL. A PLL, primeiramente, interage com essas cargas na porção mais externa do filme, como no caso de filmes com crescimento linear. Entretanto, as cadeias de PLL difundem-se também para o interior do filme. O filme passa a ter um último par de polímeros que estão interagindo fortemente e cadeias de PLL livres, que provavelmente interagem fracamente com a matriz do filme. Além disso, o sistema é dinâmico, havendo troca durante o processo de PLL ligadas e livres. Após certo tempo, as PLL livres não são, necessariamente, as cadeias que difundiram no processo de adsorção da última camada. E, finalmente, quando a solução de PLL é lavada, algumas cadeias de PLL livres presentes são removidas, como consequência da diminuição do potencial químico dentro do filme, e do aumento da barreira eletrostática que devem ser superadas pelas PLL que estão no filme. Parte das PLL armazenadas não consegue escapar das multicamadas. Quando o sistema é colocado em contato novamente com a solução de HA, essa barreira eletrostática

desaparece, por haver a neutralização de cargas, e mais algumas cadeias livres de PLL conseguem difundir para fora do filme. Essas complexam-se com o HA da superfície, formando uma nova camada de filme. O processo de deposição de HA encerra a partir do momento em que o filme não contenha mais PLL livres, ou quando as exposições de HA são lavadas, no processo de enxague (LAVALLE *et al.*, 2004; PORCEL *et al.*, 2006). Esse comportamento decorrente de crescimento exponencial foi observado previamente para sistemas de PLL/AL, que obtiveram crescimentos maiores do que lineares, porém ainda sem propor um modelo físico que explicasse as razões desse tipo de crescimento (ELBERT; HERBERT; HUBBELL, 1999).

No caso do *spray*, em que o início do crescimento é lento, acredita-se que com poucas camadas, a PLL não difunda para dentro e fora do filme que, com o aumento da espessura do filme, passa a ser acessível para a PLL. Salomäki, Vinokurov e Kankare (2005) e Hübsch *et al.* (2004) quando estudaram a transição de crescimento do regime exponencial-linear, assumiram que a cada nova deposição de polieletrólitos, ocorreu uma reestruturação do filme, conduzindo a uma densificação, que iniciou pelas partes das margens iniciais do filme, impedindo a difusão de um dos polieletrólitos constituintes de parte do filme.

Imagens de AFM foram feitas para os filmes LBL, contendo 40 camadas de polieletrólitos, cujas espessuras obtidas em cada técnica podem ser observadas nas FIGURAS 53, 54 e 55.

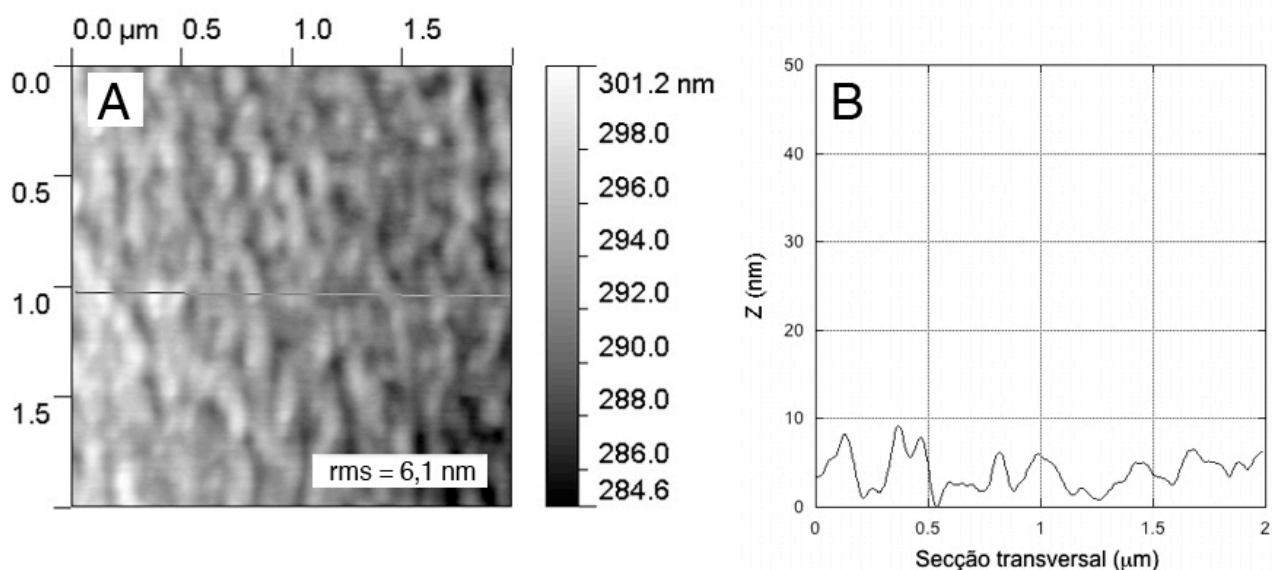


FIGURA 53 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE *SPIN-COATING* (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

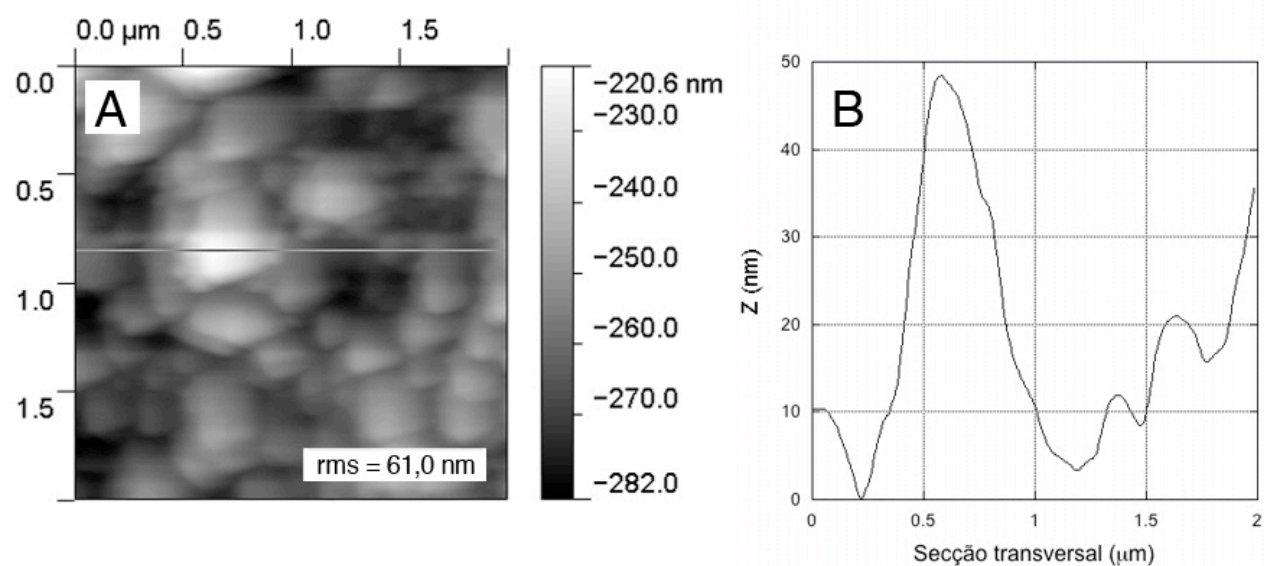


FIGURA 54 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE IMERSÃO (A). REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)

FONTE: O Autor (2011)

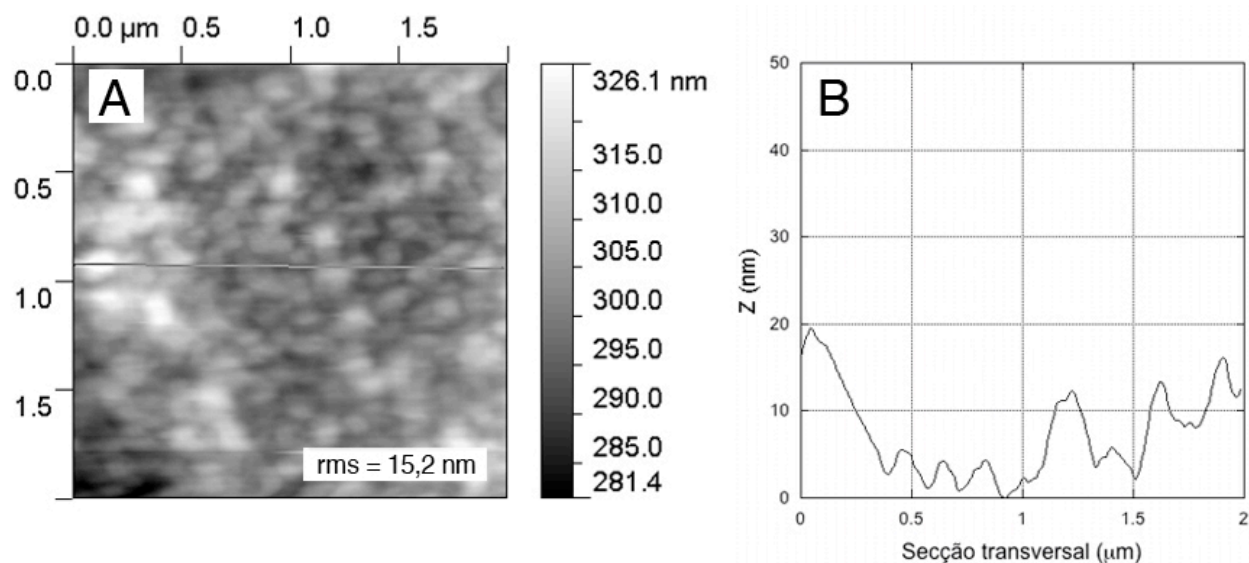


FIGURA 55 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA ($2 \times 2 \mu\text{m}$) DO FILME LBL DE GALACTOMANANA-ALGINATO E POLI-L-LISINA (GML-AL/PLL) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE *SPRAY* (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)
 FONTE: O Autor (2011)

As imagens de topografia com os respectivos cortes transversais mostraram que os filmes crescidos pelos três métodos apresentaram rugosidades bem diferentes, com valores de rms, calculados para toda imagem escaneada, variando de 15,2 para filme por *spray*, 6,1 para o por *spin-coating* e 61,0 para o por imersão. Esses valores de rugosidade podem ser explicados pelo crescimento exponencial e são provavelmente, decorrentes da difusão da PLL pelo filme, que faz com que esse não seja homogêneo e planar. As “ilhas” estão presentes nas três metodologias de deposição e são mais pronunciadas nos filmes de imersão, provavelmente por serem mais espessos e com uma cinética de deposição mais lenta. Rigoberto *et al.* (2003) mostraram que a rugosidade e as características de tamanho de filmes multicamadas mudam com o aumento da espessura, sendo que camadas mais espessas tendem a produzir partículas maiores com o aumento da rugosidade. Portanto, quanto maior a quantidade de polieletrólitos adsorvidos, maior será a coalescência das cadeias dos complexos formados por GML-AL/PLL. Provavelmente, se houvesse a continuação da adsorção dos polieletrólitos nos filmes de *spin-coating*, seriam formadas ilhas maiores. Essas imagens estão similares aos resultados apresentados para os filmes de HA/PLL (PICART *et al.*, 2001b) e para os sistemas de DNA/PLL (REN; JI; SHEN, 2006).

al., 2005). O processo de deposição foi irreversível, porque mesmo após a lavagem entre cada polieletrólito depositado, não houve alterações significativas no decaimento da frequência, indicando que pouco ou quase nenhum material foi removido.

4.4.3.4 Filmes multicamadas de galactomanana-alginato/quitosana

Outro polícatión escolhido para continuar os testes de formação de filmes LBL foi a quitosana (CHI), resultando no sistema GML-AL/CHI. Dois polissacarídeos naturais, baixa-toxicidade, e biocompatíveis foram escolhidos, visto que estudos que possam contribuir à aplicações biomédicas de filmes LBL possuem importância relevante. Além disso, os carboidratos apresentam-se estruturalmente diferentes de polímeros sintéticos, o que pode acarretar em diferente comportamento no crescimento do filme.

A FIGURA 57 comparou os resultados dos crescimentos dos filmes pelos 3 diferentes métodos empregados (imersão, *spray* e *spin-coating*). Através dos resultados obtidos, observou-se que os métodos de imersão e *spin* foram os que propiciaram a formação de filmes mais espessos, mesmo com menor número de camadas. No método de *spray*, mais camadas de polieletrólitos foram depositadas para que filmes atingissem espessura de 10 nm. Os filmes de imersão e *spin* foram mais espessos, devido ao maior tempo de contato entre as soluções com o substrato, favorecendo a cinética de adsorção. Na técnica de *spray*, como já foi explicado anteriormente para o sistema GML-AL/PLL, o substrato está em uma posição perpendicular à solução vaporizada e o líquido da superfície é drenado para fora por ação da força da gravidade, restando apenas uma fina camada de líquido na superfície (IZQUIERDO *et al.*, 2005).

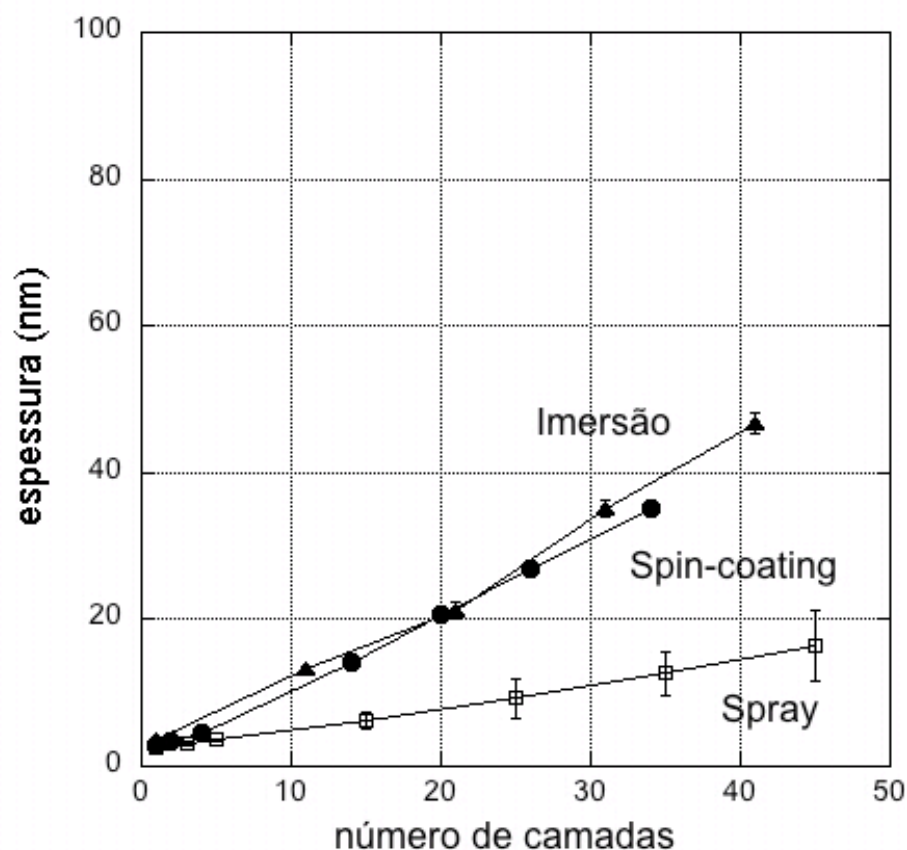


FIGURA 57 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPESSURA DOS FILMES OBTIDOS PELA TÉCNICA LBL, COMPOSTOS POR PELA MISTURA GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI), APLICANDO OS MÉTODOS DE IMERSÃO (▲), DE SPRAY (□) E SPIN-COATING (●)
 FONTE: O Autor (2011)

Analisando as equações gráficas (dados não mostrados), observou-se que em todos os métodos o crescimento dos filmes é linear. Entretanto, anteriormente, apenas o crescimento exponencial de filmes formados por polissacarídeos tinha sido demonstrado na literatura para filmes formados por quitosana e hialuronana (RICHERT *et al.*, 2004c), e que ocorria pela difusão *in* e *out* da quitosana, e não da hialuronana. Esses resultados, portanto, sugerem que no sistema GML-AL/CHI, a quitosana não deve estar conseguindo se difundir pelas várias camadas do filme, formando uma maior estabilidade no crescimento das camadas.

A caracterização das superfícies do filme GML-AL/CHI foi realizada por AFM após a deposição de 40 camadas de polieletrólitos, e está demonstrada pelas FIGURAS 58, 59 e 60.

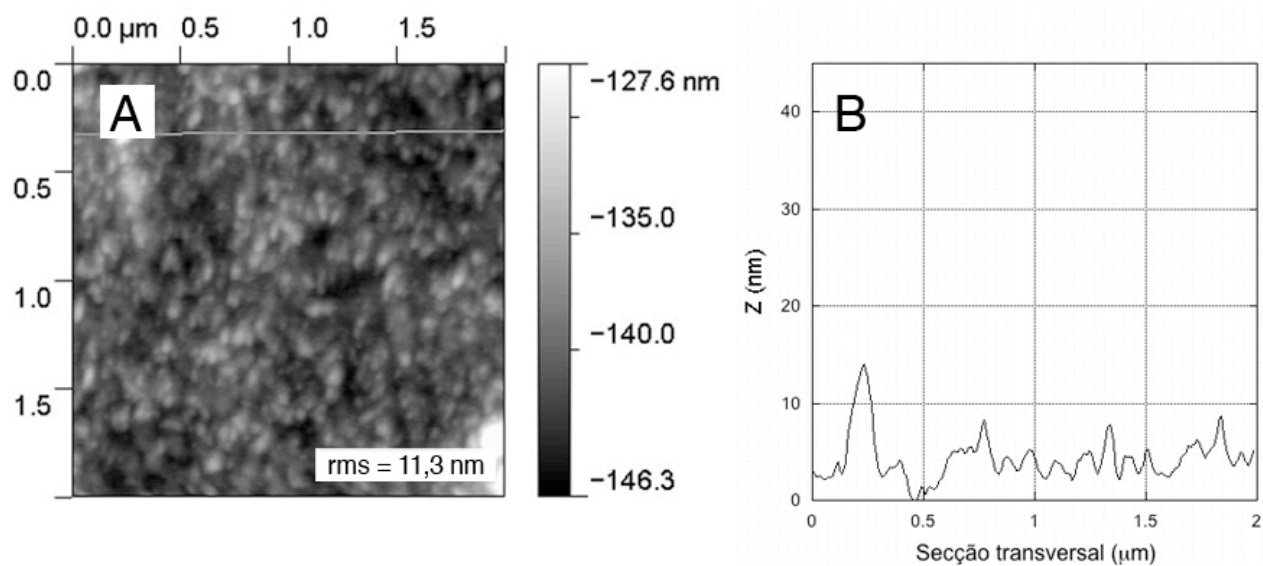


FIGURA 58 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE *SPIN-COATING* (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)
 FONTE: O Autor (2011)

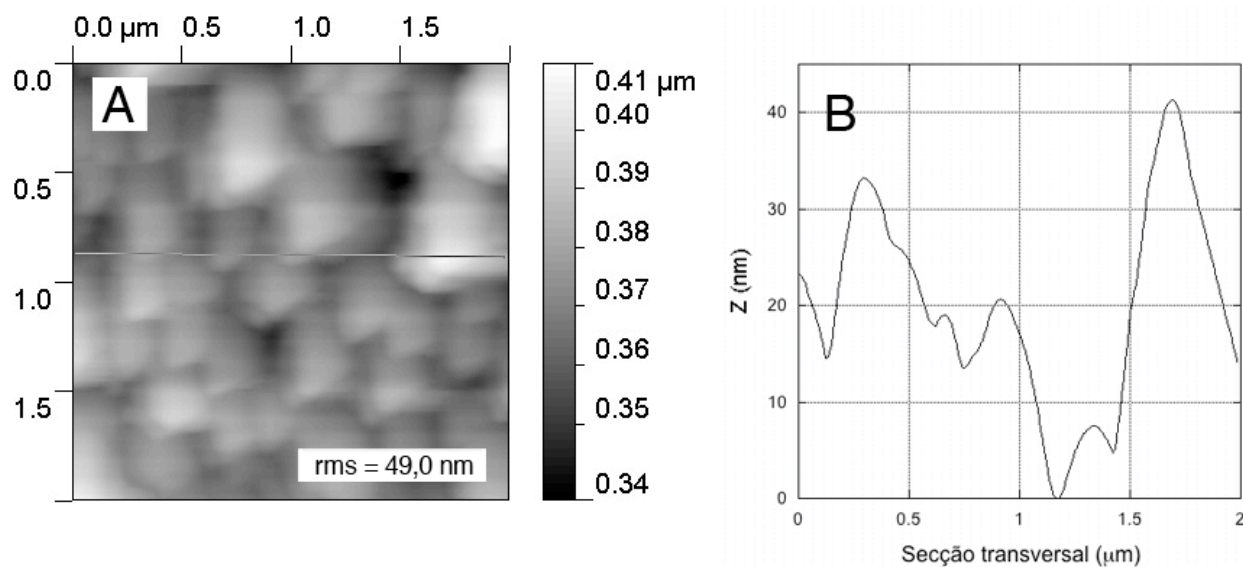


FIGURA 59 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (2 X 2 μm) DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE IMERSÃO (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)
 FONTE: O Autor (2011)

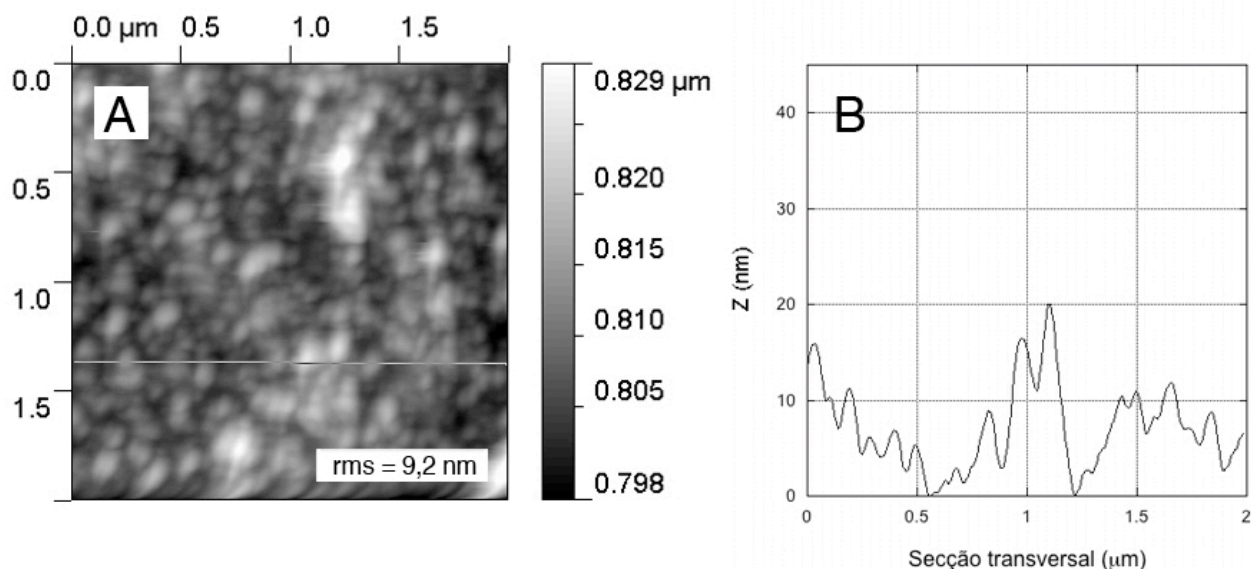


FIGURA 60 - IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA ($2 \times 2 \mu\text{m}$) DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) (40 CAMADAS) ADSORVIDO SOBRE SILÍCIO COM A TÉCNICA DE *SPRAY* (A) REPRESENTAÇÃO DA RUGOSIDADE NA LINHA DE SECÇÃO TRANSVERSAL (B)
 FONTE: O Autor (2011)

Os filmes de quitosana se apresentaram rugosos, sendo que o filme depositado por imersão foi o que possuiu o maior valor de rms da área escaneada, 49,0 nm, seguido pelo filme de *spin-coating* com 11,3 e o de *spray* com 9,2 nm. Esses dados indicaram que os filmes obtidos por metodologias rápidas, foram mais homogêneos e planos do que filmes obtidos por imersão. Diferenças significativas na superfície de cada metodologia podem ser observadas. Filmes por *spin-coating* possuíram entidades esféricas menores do que os outros dois filmes obtidos pelas outras metodologias, porém com valor de rms próximo aos filmes obtidos por *spray*. No filme correspondente à metodologia de imersão, houve a presença de grandes esferas, que podem ser atribuídas aos complexos GML-AL/CHI formados durante cada deposição, além de presença de uma superfície não homogênea, inclusive com a presença de vales. Essas esferas foram resultados da coalescência dos complexos e a razão pela qual foram mais pronunciadas nesse tipo de filme é, provavelmente, o maior tempo de deposição em que as soluções de polieletrólitos permaneceram em contato com o substrato. As imagens e os dados de AFM para o filme de imersão estão de acordo com as imagens obtidas por Richert *et al.* (2004c), quando analisou filmes de HA/CHI feitos pelo mesmo método, que apresentaram uma rugosidade de aproximadamente 35 nm.

E, finalmente, assim como para os outros sistemas LBL, foi feita a complementação das informações na formação de filmes finos por QCM-D.

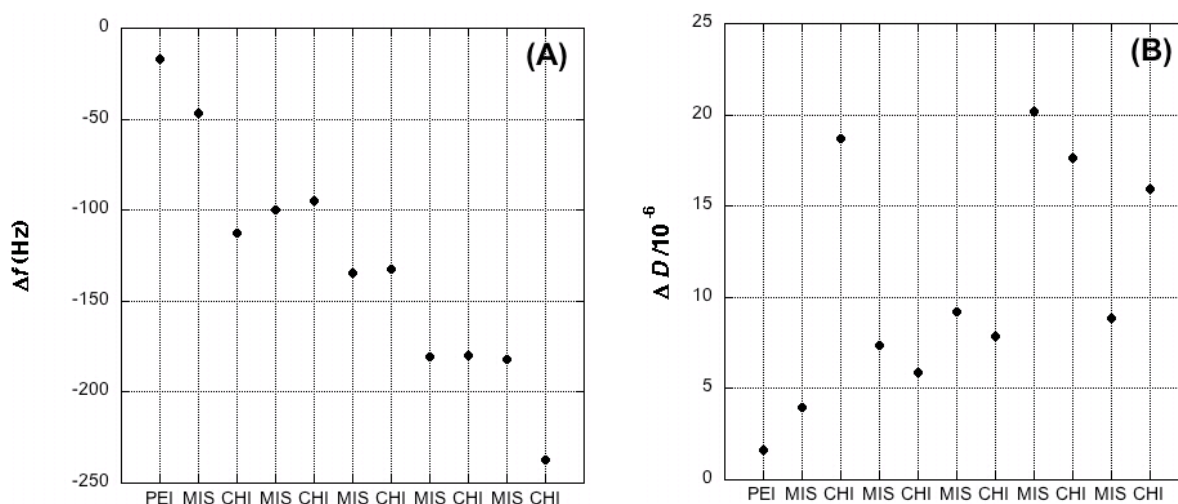


FIGURA 61 - DESLOCAMENTO DE FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA EM (A) E DISSIPACÃO EM (B) EM FUNÇÃO DAS CAMADAS DEPOSITADAS DO FILME LBL GALACTOMANANA-ALGINATO E QUITOSANA (GML-AL/CHI) FILME LBL DE GML-AL/CHI ADSORVIDO SOBRE CRISTAL DE OURO, E MEDIDOS POR QCM-D. DADOS REFERENTES À FREQUÊNCIA DE 25 Hz

FONTE: O Autor (2011)

A FIGURA 61 mostra os deslocamentos de frequência (A) e dissipação (B) a cada nova adsorção de polieletrólitos. Apesar de observar a deposição de massa, isso é o crescimento do filme, observou-se que o decaimento da frequência não foi constante e nem linear, assim como o aumento da dissipação. Durante a fase de crescimento, a espessura do filme aumentou apenas quando o filme foi posto em contato com a solução de poliânion, e manteve-se praticamente inalterado a cada deposição da solução de policátion. Esse comportamento foi apresentado também para filmes que estão crescendo exponencialmente, e a dependência de crescimento através apenas de um dos polieletrólitos já foi evidenciada anteriormente em filmes LBL por Radeva, Milkova e Petkanchin (2003) e por Hübsch *et al.* (2004).

A cada processo de lavagem após a adsorção da mistura GML-AL ou da CHI, observou-se uma dessorção discreta desses polímeros. Esse comportamento foi evidenciado também para sistemas de HA/CHI (RICHERT *et al.*, 2004c) e pode ser atribuído a redissolução dos complexos de polieletrólitos que estão na margem

do filme, em contato com a solução (KOVACEVIC *et al.*, 2002). Deve-se ressaltar que as medidas de frequência refletem a deposição da massa combinada dos polieletrólitos juntamente com a água, em que ambos contribuem para a alteração no sinal (FEILER *et al.*, 2007). Pelo gráfico de dissipação, observou-se que há um aumento nos valores a cada deposição, resultado da adsorção no cristal de uma camada com estruturas não rígidas. Além disso, observou-se uma provável mobilização de água entrando e saindo do sistema (FIGURA 61) sugerindo que as cadeias de polissacarídeos devem ter se reorganizado durante o processo de deposição, provocando expansão e contracção do filme, até mesmo “expulsando” água do filme (SCHNEIDER *et al.* 2007). Alves, Picart e Mano (2009) estudaram o sistema CHI/AL na formação de filmes por QCM-D, em que também foi realizada a deposição de camadas com comportamento viscoelástico obtendo, entretanto, decaimentos lineares e regulares.

4.5 TESTES DE ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE OS FILMES MULTICAMADAS

Como a LBL é uma técnica que permite a deposição em sua superfície de qualquer tipo de material em relação a tamanho, forma e tipo (VAUTIER *et al.*, 2003; THIERRY *et al.*, 2003), e por serem filmes promissores na aplicação de adesão celular pela facilidade do preparo por adequar suas propriedades biofuncionais, tais como química e mecânica (WITTMER *et al.*, 2007); e também aliado às características de baixa citotoxicidade e biocompatibilidade da GML e AL, decidiu-se fazer uma aplicação biológica desses materiais na forma de nanofilmes.

A habilidade de formar filmes de multicamadas tendo estruturas mais espessas é importante porque foi demonstrado que a espessura das camadas de polieletrólitos em uma superfície, favorece a bioinércia sobre um substrato (ELBERT; HERBERT; HUBBELL, 1999). Para fazer esses testes, utilizou-se um dos filmes de cada um dos sistemas: GM-AL/PAH, GM-AL/PLL e GM-AL/CHI, feitos por imersão, com 10 camadas de polieletrólitos adsorvidos.

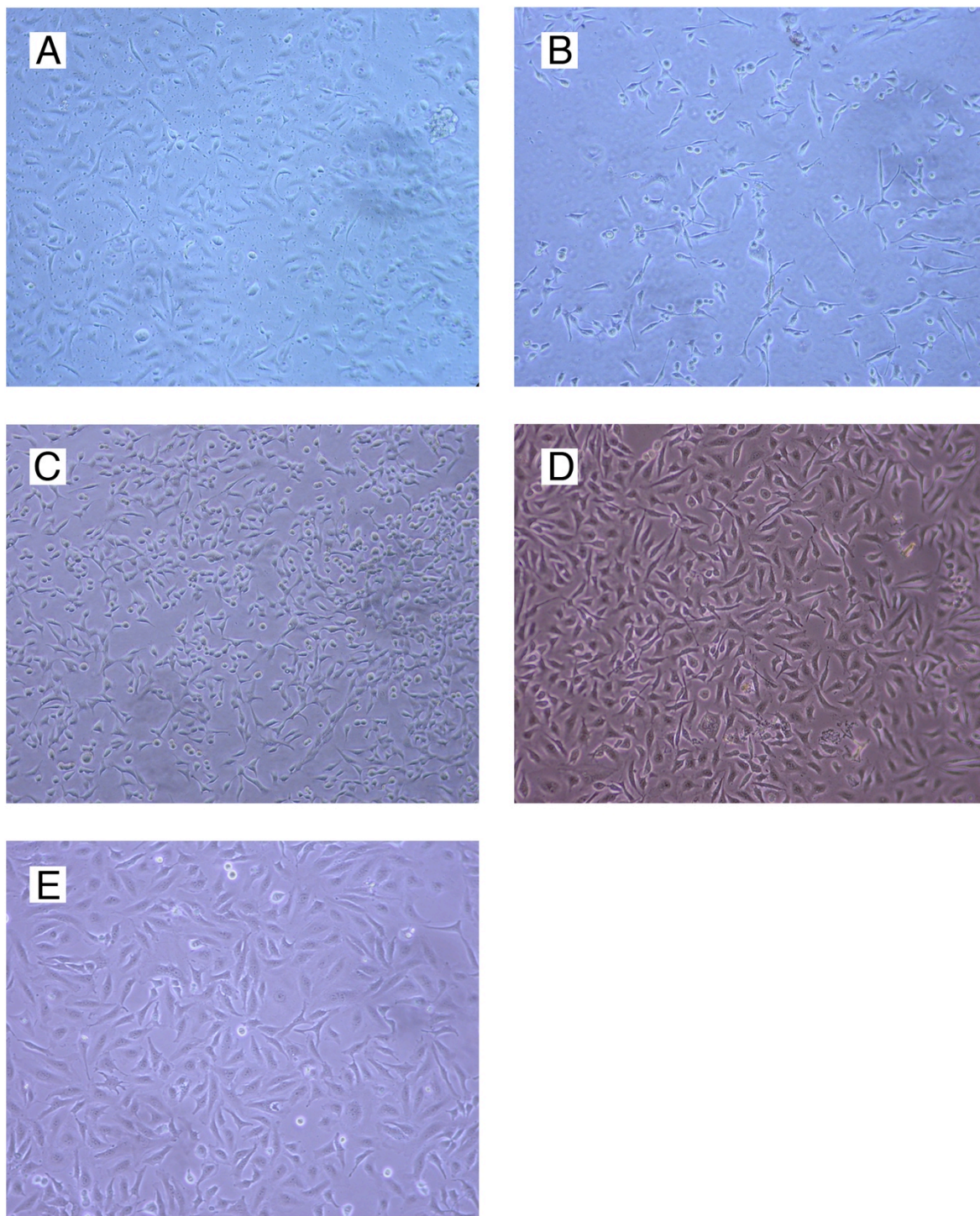


FIGURA 62 – IMAGENS DE CÉLULAS HeLa CRESCIDAS NOS (A) FILMES MULTICAMADAS (10 MULTICAMADAS) POR 24 h DE (A) GML-AL/PAH, (B) GML-AL/PLL, (C) GML-AL/CHI, (D) GML-AL/PAH, APÓS 8 DIAS, (E) CONTROLE NEGATIVO
 FONTE: O Autor (2011)

Primeiramente, os filmes foram esterilizados, postos em placas de cultivo celular e células HeLa foram colocadas para avaliar o crescimento sobre esses

suportes. O acompanhamento do crescimento e do espalhamento foram feitos por 24h a 8 dias. Após o tempo necessário para as análises, as placas foram retiradas da estufa de incubação e submetidas a fotografias ópticas. As imagens estão demonstradas na FIGURA 62.

As células HeLa crescidas foram observadas após 24h de incubação (FIGURA 62) com os filmes multicamadas. Essas células além de crescerem, também se espalharam pela superfície dos filmes. O crescimento celular foi comparado com um poço que não continha o filme (FIGURA 62E).

Um dos fatores para adesão celular é a rigidez dos filmes. Entretanto, filmes formados por polissacarídeos tendem a serem menos rígidos do que filmes formados por polímeros sintéticos. A presença de crescimento celular nas superfícies dos filmes pode ser decorrente das ligações cruzadas entre as camadas de polieletrólitos que foram formadas durante o processo de esterilização por autoclave em vapor úmido, conforme relatado anteriormente para filmes de PAH/PAA (ácido poliacrílico) (PAVOOR *et al.*, 2004; KITTREDGE; DURST; KITTREDGE, 2010). Esse processo pode tornar os filmes mais rígidos do que os filmes não esterilizados. Na esterelização dos filmes por luz UV, onde não há reticulação, pouco ou nenhum crescimento celular foi observado.

Visualmente, o filme contendo PLL (FIGURA 62B) foi o que apresentou menor número de células crescidas e espalhadas. Picart *et al.* (2005) haviam observado que filmes feitos por PLL/PGA (ácido poli-L-glutâmico) e por PLL/AL, sem modificações, apresentaram uma menor taxa de adesão celular. Entretanto, modificações por ligações cruzadas pelo agente sulfo-NHS deixaram os filmes mais rígidos, assim como os filmes nos quais foram introduzidos um estímulo químico pela introdução de 15 aminoácidos contendo a sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), aumentando a taxa de adesão. Filmes que possuem alta tendência de expansão e de hidratação, tendem a ser mais pobres na aderência de células (DISCHER; JANMEY; WANG, 2005). O filme contendo PLL foi o que apresentou os maiores valores para as alterações no valor de dissipação por QCM-D. Essa seria provavelmente a razão pela qual nos filmes contendo PAH apresentaram um grande número de células crescidas e espalhadas (FIGURA 62A); já que filmes com esse polímero tendem a ser mais rígidos e possuir uma maior espessura, conforme foi visto por elipsometria nos dados anteriores.

Apesar do PAH já ter sido estudado em filmes de adesão e mostrar também bons resultados para filmes finos, com aproximadamente 10-15 nm (SHIN; JO; MIKOS, 2003), em termos de biocompatibilidade, os filmes formados por esses polímeros sintéticos podem não ser apropriados para algumas aplicações biológicas (AI; JONES; LVOV, 2003b) e, com isso, a aplicabilidade de PLL e CHI tornam-se mais interessantes.

Análises com o reagente *Trypan Blue* foram realizadas para contar a quantidade de células que estavam mortas sobre os filmes incubados após 24h ou 8 dias. Teoricamente, se as células não conseguissem aderir nos filmes, essas não conseguiriam se replicar e se espalhar. Portanto, a alta viabilidade celular observada por todos os filmes (valores próximo a 98%) indicou que as células aderiram e cresceram sobre os filmes de polímeros.

O crescimento das células foi acompanhado por até 8 dias, em todos os sistemas de filmes testados. Na FIGURA 62D está demonstrado apenas um dos tipos, para simplificação dos resultados, já que as imagens obtidas foram similares. Mesmo após 8 dias, as células continuaram crescendo e se espalhando, com uma mortalidade em torno de 2% ($\pm 0,2$). Isso significa que os filmes formados por GML-AL são potenciais materiais para serem explorados em estudos de aplicabilidade biológica, podendo ser um potencial modelo para estudos de adesão, assim como em utilizações terapêuticas para engenharia de tecidos.

A FIGURA 63 representa o protocolo desenvolvido. O polycation PEI foi adsorvido inicialmente em substrato de silício, para a partir dele, depositar as camadas alternadas de poliânion e polycation. O poliânion do trabalho sempre foi o mesmo, a mistura GML-AL, e o polycation variou entre 3 polímeros, o PAH, a PLL e a CHI. A partir desses filmes crescidos em multicamadas, células foram colocadas sobre a superfície dos filmes e os comportamentos de crescimento e espalhamento foram observados por até 8 dias.

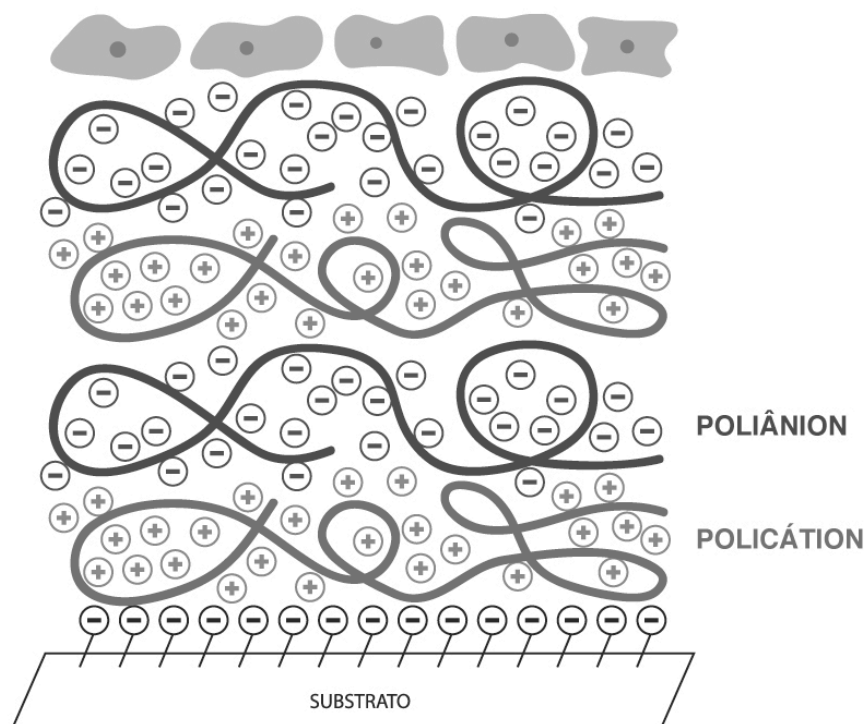


FIGURA 63 – ESQUEMA REPRESENTANDO OS FILMES MULTICAMADAS, FORMADOS PELAS DEPOSIÇÕES ALTERNADAS DE POLICÁTION E POLIÂNION, COM A ADSORÇÃO DE CÉLULAS SOBRE A SUPERFÍCIE DESSES FILMES
 FONTE: O Autor (2011)

5. CONCLUSÕES

O trabalho apresentado foi desenvolvido a partir de polissacarídeos naturais, a galactomanana e o alginato. A partir dos resultados obtidos para a galactomanana de sementes de leucena e para interação entre a galactomanana e o alginato, foi possível desenvolver e caracterizar dois tipos de nanofilmes, os filmes monocamadas e os filmes multicamadas.

A formação de nanofilmes sobre superfícies sólidas tem grande importância tecnológica no desenvolvimento de biossensores e em aplicações biomédicas. A adsorção dos polissacarídeos estudados em substratos sólidos forneceu uma base para a imobilização de biomoléculas, tais como proteínas e vírus. Além disso, a mistura galactomanana-alginato se mostrou um suporte eficiente na área biológica de adesão celular.

Portanto, todos esses resultados somados indicam que a GML de leucena, um polissacarídeo obtido de fontes renováveis naturais, abundantes na natureza e de baixo custo, pode ser um substrato com grande potencial a ser explorado no desenvolvimento e aplicação de dispositivos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 5-28, nov. 2004.
- AHMED, S.A.; TANAKA, M.; ANDO, H.; TAWA, K.; KIMURA, K. Fluorescence emission control and switching of oxymethylcrowned spirobenzopyrans by metal ion. **Tetrahedron**, Oxford, v. 60, n. 28, p. 6029-6036, dez. 2004.
- AI, S.F.; LU, G.; HE, Q.; LI, J. Highly flexible polyelectrolyte nanotubes. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.125, n. 37, p. 11140-11141, ago. 2003a.
- AI, H.; JONES, S.A.; LVOV, Y.M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes and nanoparticles. **Cell Biochem. Biophys.**, New York, v. 39, n. 1, p. 23, ago. 2003b.
- AL-KHOURI, S. **UV/VIS and CD spectral studies of the interaction between pinacyanol chloride and alginates, γ -cyclodextrin, and aerosol- OT**. 120 f. Tese. (Doutorado em Ciências Naturais) - Universität Duisburg, Essen, Alemanha, 2003.
- ALVES, N.M.; PICART, C.; MANO, J.F. Self assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by QCM and IR spectroscopy. **Macromol. Biosci.**, Weinheim, v. 9, n. 8, p. 776-785, ago. 2009.
- AMARAL, J. **Estudo reológico da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa***. 123 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.
- AMIJI, M. M. Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 26, n. 3, p. 211-213, jan.1995.
- ANTHONSEN, M.W.; SMIDSRØD, O. Hydrogen ion titration of chitosan with varying degrees of *N*-acetylation by monitoring induced ^1H -NMR chemical shifts. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 26, n. 4, p. 303, 1995.
- ANZAI, J. I.; KOBAYASHI, Y.; NAKAMURA, N.; NISHIMURA, M.; HOSHI, T. Layer-by-layer construction of multilayer thin films composed of avidin and biotin-labeled poly(amine)s. **Langmuir**, Washington, v. 15, n. 1, p. 221-226, jan. 1999.
- ARIGA, K.; MCSCHANE, M.; LVOV, Y.M.; JI, Q. HILL, J.P. Layer-by-layer assembly for drug delivery and related applications. **Expert Opin. Drug Deliv.** London, v. 8, n. 1-12, mar. 2011.
- ATTHOFF, B.; HILBORN, J. Protein adsorption onto polyester surfaces: Is there a need for surface activation? **J Biomed Mat Res B: App Biomat**, Hoboken, v. 80, n. 1, p. 121-130, jan. 2007.

AUGSTEN, C.; MÄDER, K. Characterizing molar mass distributions and molecule structures of different chitosans using asymmetrical flow field-flow fractionation combined with multi-angle light scattering. **Int. J. Pharm.** Amsterdam, v. 351, n.1-2, p. 23-30, mar. 2008.

AUTSCHBACH, J. Universidade de Buffalo. Disponível em: <http://www.nsm.buffalo.edu/~jochena/research/opticalactivity.html>. Acesso em: 20 de março de 2007.

AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, Essex, v. 21, n. 5, p. 551-556, mai. 2002.

AZZAM, R.M.A.; BASHARA, N.M. **Ellipsometry and Polarized Light**, North Holland Publication: Amsterdam, 1977.

AZZARONI, O.; FONTICELLI, M.H.; BENÍTEZ, G.; SCHILARDI, P.L.; GAGO, R.; CARETTI, I.; VÁZQUEZ L.; SALVAREZZA, R.C. Direct nanopatterning of metal surfaces using self-assembled molecular films. **Adv. Mater.**, Weinheim, v. 16, n. 5, 405-409, mar. 2004.

BALL, V.; HÜBSCH, E.; SCHWEISS, R.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P.; KNOLL, W. Interactions between multivalent ions and exponentially growing multilayers: dissolution and exchange processes. **Langmuir**, Washington, v. 21, n. 18, p. 8526-8531, ago. 2005.

BAYER, C.L.; HERRERO, E.P.; PEPPAS; N.A. Alginate films as macromolecular imprinted matrices. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, Leiden, v. 22, n. 11, p. 1523-1534, jul. 2011.

BECKER, J.W.; REEKE, G.N.; CUNNINGHAM, B.A.; EDELMAN, G.M. New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A. **Nature**, London, v. 259, p. 406-409, 1976.

BEER, M.U.; WOOD, P.J.; WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 39, n. 4, p. 377-380, ago. 1999.

BELDER, A. N. de; GRANATH, K. (1973). Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 375–378, out. 1973.

BENKIRANE-JESSEL, N.; LAVALLE, P.; BALL, V.; OGIER, J.; SENGHER, B.; PICART, C.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; DECHER, G. **Polyelectrolyte Multilayer Films** – A general approach to (bio)functional coatings. In: Macromolecular Engineering, Precise Synthesis, Materials Properties, Applications. Weinheim: Wiley-Vch, 2007.

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L.H.C. Estudo de polímeros por microscopia de força atômica. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, 2003.

BERNE, B.J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering with applications to chemistry**. In: Biology and Physics. New York: Wiley Intersciences, 1976.

BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER. Atomic force micro-scope. **Phys. Rev. Lett.**, New York, v. 56, n. 9, p. 930–933, mar. 1986.

BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy – from birth to adolescence (Nobel lecture). **Angew. Chem.**, Weinheim, v. 26, n. 7, p. 606-614, jul. 1987.

BLACKLOCK, J.; MAO, G.; OUPICKY, D.; MÖHAWALD, H. DNA release dynamics from bio-reducible layer-by-layer films. **Langmuir**, Washington, v. 26, n. 11, p. 8597-8605, fev. 2010.

BLAINE, M.G. Experimental observations on absorbable alginate products in surgery. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 125, n. 1, p. 102–114, jan. 1947.

BLODGETT, K.B.; LANGMUIR, I. Built-up films of barium stearate and their optical properties. **Phys. Rev.**, New York, v. 51, n. 11, p. 964-82, mar. 1937.

BOULMEDAIS, F.; BALL, V.; SCHWINTÉ; FRISCH, B.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C. Buildup of exponentially growing multilayer polypeptide films with internal secondary structure. **Langmuir**, Washington, v. 19, n. 2, p. 440-445, jan. 2003.

BOUVENG, H.O.; LINDBERG, B. Hydrolysis of Methylated Polysaccharides. In: BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L.; SHAW, D.H. (Eds). **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1965, p. 296-298.

BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. **J. Mol. Biol.**, London, v. 138, n. 2, p. 149-178, abr. 1980.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H.; **Polymer Handbook**, 2 ed., New York: John Wiley & Sons, 1966.

BRANT, D.A.; FLORY, P. J. The configuration of random polypeptide chains. I. Experimental results. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 87, n. 13, p. 2788-2791, jul. 1965.

BRESOLIN, T.M.B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOSKI, M-R; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 33, n. 2-3, p.131-138, jun-jul. 1997.

BRESOLIN, T.M.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **Int. J. Biol. Macromol.** Guildford, v. 23, n. 4, p. 263-275, nov. 1998.

BRIGGS, D.; SEAH, M.P. Practical surface analysis, Part I. Auger and X-ray photoelectron spectroscopy. 2 ed. John Wiley & Sons Ltd.: Londres, 1996.

BRUENING, M.; DOTZAUER, D. Polymer films: just spray it. **Nature Materials**, London, v. 8, n. 6, p. 449-450, jun. 2009.

BRYNDA, E.; HOUSKA, M. J. Multiple alternating molecular layers of albumin and heparin on solid surfaces. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 183, n. 1, p. 18-25, out. 1996.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.; MALUF, A.M. Galactomanana de sementes de diferentes populações de *Leucaena leucocephala*. **Rev. Bras. Bot**, São Paulo, v.10, n.1, p. 25-27, 1987.

BUFFINGTON, L.A.; STEVENS, E.S.; MORRIS, E.R.; REES, D.A. Vacuum ultraviolet circular dichroism of galactomannans. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 2, n. 4, p. 199-203, ago. 1980.

CALVO, E.J.; DANILOWICZ, A.; WOLOSUK, A. Molecular "wiring" enzymes in organized nanostructures. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 124, n. 11, p. 2452, mar. 2002.

CAMPANA, P. T.; MORAES, D. I.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; BELTRAMINI, L. M. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 269, n. 3, p. 753-758, fev. 2002.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.,G.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 85, n.3, p. 522-528, jun. 2011.

CARTER, D. C.; HO, J. X. **Adv. Protein Chem.** Huntsville/Alabama: Academic Press, 1994, v. 45.

CARVER, J.P.; MICHNICK, S.W.; IMBERTY, A.; CUMMING, D.A. Oligosaccharide-protein interactions: a three-dimensional view. **Ciba Found Symp.**, v.145, p.6-18, 1989.

CARUSO, F.; NIIKURA, K. FURLONG, D.N.; OKAHATA, Y. Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing. **Langmuir**, Washington, v. 13, n. 13, p. 3427 – 3433, jun.1997.

CARUSO, F.; MÖHWALD, H. Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self-assembly technique. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 121, p. 6039-6042, jun. 1999a.

CARUSO, F.; LICHTENFELD, H.; DONATH, E.; MOHWALD, H. Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayers films: binding of anionic

fluorescent probes to layers assembled onto colloids. **Macromolecules**, Easton, v. 32, n. 7, p. 2317-2328, abr. 1999b.

CASTNER, D.G.; RATNER, B.D. Biomedical surface science: foundations to frontier. **Surf.Sci.** Amsterdam, v. 500, n. 1-3, p. 28-60, mar. 2002.

CASTRO, L.B.R.; KAPPL, M.; PETRI, D.F.S. Assemblies of concanavalin A onto carboxymethylcellulose. **J. Nanosci. Nanotech.**, Stevenson Ranch, v.5, n. 12, p. 2063- 2069, dez. 2005.

CHANDRIA, N. P.; MATSUHIRO, B.; VASQUEZ, A. E. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR. **Carbohydr.Polym.**, Barking, v. 46, n.1, p. 81–87, set. 2001.

CHEN, Q.; TANG, W.; WANG, D.; WU, X.; LI, N.; LIU, F. Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles. **Biosens. Bioeletron.**, Essex, v. 26, n. 12, p. 575-579, out. 2010.

CHIARELLI, G.; JOHAL, M.S.; CASSON, J.L.; ROBERTS, J.B.; ROBINSON, J.M.; WANG, H.-L. Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayers thin films using spin-assembly. **Adv. Mater.**, Weinheim, v. 13, n. 15, p. 1167-1171, ago. 2001.

CHILKOTI, A.; RATNER, B.D. Chemical derivatization methods for enhancing the analytical capabilities of X-ray photoelectron spectroscopy and static secondary ion mass spectrometry. In: Surface characterization of advanced polymers. Ed. SABBATINI, L.; ZAMBONIN, P.G. Weinheim: VCH, p. 221-256, 1993.

CHLUBA, J.; VOEGEL, J.-C.; DECHER, G.; ERBACHER, P.; SCHAAF, P.; OGIER, J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. **Biomacromolecules**, Washington, v. 2, n. 3, p. 800-805, jun. 2001.

CHO, J.; CHAR, K.; HONG, J.-D.; LEE, K.-B. Fabrication of highly ordered multilayer films using a spin self-assembly method. **Adv. Mater.**, Weinheim, v. 13, n. 14, p. 1076-1078, jul. 2001.

CHO, N.J.; CHO, S.J.; CHEONG, K.H.; GLENN, J.S.; FRANK, C.W. Employing an amphipathic viral peptide to create a lipid bilayer on Au and TiO₂. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 129, n. 33, p. 10050–10051, jul. 2007.

CHO, W.J.; OH, S.H.; LEE, J.H. Alginate films as a novel post-surgical tissue adhesion barrier. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, Leiden, v. 21, n. 6, p. 701-713, abr. 2010.

CHRESTANI, F.; SIERAKOWSKI, M.-R.; UCHOA, D.E.A.; NOZAWA, C.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; ONO, L. *In vitro* antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 45, n. 5, p. 453-457, dez. 2009.

CICCOLI, L.; SIGNORINI, C.; ALESSANDRINI, C.; FERRALI, M. ; COMPORTI, M. Iron release, lipid peroxidation and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine. **Exp. Mol. Pathol.**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 108-118, abr. 1994.

CLEMENTE-LEON, M.; CORONADO, E.; SORIANO-PORTILLO, A.; MINGOTAUD, C.; DOMINGUEZ-VERA, J.M. Langmuir–Blodgett films based on inorganic molecular complexes with magnetic or optical properties. **Adv. Colloid Interface Sci.** Amsterdam, v. 116, n. 1-3, p.193 – 203, nov. 2005.

COEN, M. C.; LEHMANN, R.; GRONING, P.; BIELMANN, M.; GALLI, C.; SCHLAPBACH, L. Adsorption and bioactivity of protein A on silicon surfaces studied by AFM and XPS. **J. Colloid Interface Sci.** New York, v. 233, n. 2, p. 180-189, jan. 2001.

COHEN, S.; LOBEL, E.; TREVGODA A.; PELED, Y. A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 44, n. 2-3, p. 201–208, fev.1997.

COOK, A. D.; HRKACH, J. S.; GAO, N. N.; JOHNSON, I. M.; PAJVANI, U. B.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. J. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 35, n.4, p. 513-523, jun.1997.

CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA J. P. A. Purification of guar gum for biological applications. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 41, n.3, p.324-331, ago. 2007.

DAVIS, T. A.; LLANES, F.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. Metal selectivity of *Sargassum* spp. and their alginates in relation to their α -L-guluronic acid content and conformation. **Environ. Sci. Technol.**, Easton, v. 37, n. 2, p. 261–267, jan. 2003.

DAVIS, F.; HIGSON, S.P.J. Structured thin film as functional components within biosensors. **Biosens. Bioelectron.**, Essex, v. 21, v. 1, p. 1-20, jul. 2005.

DEA, I.C.M.; MORRINSON, A. Chemistry and interactions on seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York, v. 31, p. 241-312, 1975.

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, Washington, v. 277, p. 1232 - 1237, ago. 1997.

DECHER, G.; HONG, J.D; SCHIMTT, J. Buildup of ultrathin multilayers films by a self-assembly process: alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, Lausanne, v. 210-211, parte 2, p. 831-835, abr.1992.

DERJAGUIN; B.V.; LANDAU, L. Theory of the stability of highly charged lyophobic sols and coalescence of highly charged particles in electrolyte solutions. **Acta Physicochim. URSS**, Moscow, v. 14, n. 633, p. 633-652, 1941;

DEREWENDA, Z.; YARIV, J.; HELLIWELL, J.R.; KALB, A.J.; DODSON, E.J., PAPIZ, M. Z.; WAN, T.; CAMPBELL, J. The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. **EMBO J.**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 2189-2193, ago. 1989.

DENTINI, M.; CAUCCI, D.; BARBETTA, A.; CRESCENZI, V.; SJAK-BRAEK, G.; CAPITANI, D.; MANNINA, L.; VIEL, S. C6-oxidation and c5 epimerization of locust bean galactomannan studied by high field NMR and circular dichroism. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 1, p. 54-63, jan. 2006.

DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York, v. 35, p. 341-376, 1978.

DISCHER, D. E.; JANMEY, P.; WANG, Y. Tissue cell feel and respond to the stiffness of their substrate. **Science**, Washington, v. 310, p. 1139-1143, nov. 2005.

DIXON, M. C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. **J. Biomol. Tech.**, Bethesda, v. 19, n. 3, p. 151–158, jul. 2008.

DONG, D.C.; WINNIK, M.A. The py solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with ET and Y values. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 35, n.1, p. 17-21, jan. 1982.

DOWLING, K.C., THOMAS, J.K. A novel micellar synthesis and photophysical characterization of water-soluble acrylamide-styrene block copolymers. **Macromolecules**, Easton, v. 23, n. 4, p. 1059–1064, fev. 1990.

DUALEH, A.J.; STEINER, C.A. Hydrophobic microphase formation in surfactant solutions containing an amphiphilic graft copolymer. **Macromolecules**, Easton, v. 23, n. 1, p. 251-255, jan. 1990.

DUBAS, S.T.; SCHLENOFF, J.B. Factors controlling the growth of polyelectrolytes multilayers. **Macromolecules**, Easton, v. 32, n. 24, p. 8153-8160, nov. 1999.

DÚRAN, N.; MATTOSO, L. H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia**: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Carlos: Artliber Editora LTDA, 2006.

EISELT, P.; YEH, J.; LATTALA, R.K.; SHEA, L.D.; MOONEY, D.J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. **Biomaterials**, Surrey, v. 21, n. 19, p. 1921-1927, out. 2000.

ELBERT, D.L.; HERBERT, C.B.; HUBBEL, J.A. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. **Langmuir**, Washington, v. 15, n. 16, p. 5355-5362, jun. 1999.

EROKHIN, V. Langmuir-Blodgett films of biological molecules. NALWA, H.S. (Ed.) **Handbook of thin film materials**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 523-558.

FÄLDT, P.; BERGENSTAHL, B.; CARLSON, G. The surface coverage of lipids on food powders analyzed by ESCA. **Food Struct.**, Chicago, v.12, n.1, p. 225-234, 1993.

FEILER, A.A.; SAHLHOLM, A.; SANDBERG, T.; CALDWELL, K.D. Adsorption and viscoelastic properties of fractionated mucin (BSM) and bovine serum albumin (BSA) studied with quartz crystal microbalance (QCM-D). **J. Colloidal Interface Sci.**, Amsterdam, v. 315, n. 2, p. 475-481, nov. 2007.

FÉLIX, O.; ZHENG, Z.; COUSIN, F.; DECHER, G. Are sprayed Lbl-films stratified? A first assessment of the nanostructured os spray-assembled multilayers by neutron reflectometry. **C.R. Chim.**, Amsterdam, v. 12, n. 1-2, p. 225-234, jan-fev. 2009.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protective against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 416, n. 2, p. 123-129, out. 1997.

FOUREST, E.; VOLESKY, B. Alginate properties and heavy metal biosorption by marine algae. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 67, n. 3, p. 33–44, set. 1997.

FRITZSCHE, W.; SCHAPER, A.; JOVIN, T.M. Probing chromatin with the scanning force microscope. **Chromosoma**, Berlin, v. 103, n. 4, p. 231-236, jul.1994.

FUJIMOTO, J.; PETRI, D.F.S. Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces. **Langmuir**, Washington, v. 17, n. 1, p. 56-60, jan. 2001.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 8, n. 3, p. 161–182, mai. 1988.

GAIANI, C.; EHRHARDT, J. J.; SCHER, J.; HARDY, J.; DESOBRY, S.; BANON S. Surface composition of dairy powders observed by X-ray photoelectron spectroscopy and effects on their rehydration properties. **Colloids Surf. B**, Amsterdam, v. 49, n.1, p. 71–78, abr. 2006.

GANTER, J.L.M.S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M-R; REICHER, F. Structural studies on galactomannan from Brazilian seeds. **Carbohydr. Chem.**, London, v. 12, n. 6, p. 753-767, 1993.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol**, Guildford, v. 17, n.1, p. 13-19, dez. 1995.

GASEROD, O.; SMIDSRØD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Microcapsules of alginate-chitosan – A quantative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials**, Surrey, v. 19, n. 20, p. 1815-1825, out. 1998.

GATES, B.D.; XU, Q.; STEWART, M.; RYAN, D.; WILLSON C.G.; WHITESIDES, G.M. **Chem. Rev.**, Washington, v. 105, n. 4, p. 1171- 1196, mar. 2005.

GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Willd e *Mimosa scabrella* Bethan**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

GIDLEY, M. J.; LILLFORD, P. J.; ROWLANDS, D. W.; LANG, P.; DENTIN, M.; CRESCENZI, V.; EDWARDS, M.; FANUTTI, C.; REID, J. S. G. Structure and solution properties of tamarind seed polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 214, n. 2, p. 299-314, jul. 1991.

GLICKSMAN, M. Tara gums. In: _____ (Ed.). **Food Hydrocol.**, Oxford, v.3, 1986, p. 185-189.

GOFF; H.D.; FERDINANDO, D.; SCHORSCH, C. Fluorescence microscopy to study galactomannan structure in frozen sucrose and milk protein solution. **Food Hydrocol.**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 353-362, jul. 1999.

GOLDSTEIN, I. J.; HOLLERMAN, C. E.; SMITH, E. E. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides. **Biochemistry.**, Easton, v. 4, n. 5, p. 876-883, 1965.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 267- 285, mai.1998.

GOYCOOLEA, F.M.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 29, n. 3, p.181-192, out. 2001.

GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. ¹³C-NMR studies of alginate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 56, n. 2, jul. 1977.

GROSSIN, L.; CORTIAL, D.; SAULNIER, B.; FÉLIX, O.; CHASSEPOT, A.; DECHER, G.; NETTER, SCHAAF, P.; GILLET, P.; MAINARD, D.; VOEGEL, J.-C.; BENKIRANE-JESSEL, N. Step-by-step build-up of biologically active cell-containing stratified films aimed at tissue engineering. **Adv. Mater.**, Weinheim v. 21, n. 6, p. 650-655, fev. 2009.

GU, J.; BULLWINKEL, M.D.; CAMPBELL, G.A. Measurement and modeling of solvent removal for spin coating. **Polym. Eng. Sci.**, Standford, v. 36, n. 7, p. 1019-1026, abr. 1996.

Haidara, H.; Ayda, B.; Viallier, P. Morphology-dependent properties and swelling –induced transition in sodium-alginate/urea thin films. **Polymer**, Cincinnati, v. 45, n. 25, p. 8333-8338, nov. 2004.

HALL, D.B.; UNDERHILL, P.; TORKELESON, J.M. Spin coating of thin and ultrathin film polymer films. **Polym. Eng. Sci.**, Stanford, v. 38, n. 12, p. 2039-2045, dez.1998.

HALSTEAD, S.B. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Ed.) **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. London: Cab International, 1997, p. 23-44.

HARDING, S.E.; **Analysis of Polysaccharides by Ultracentrifugation. Size, Conformation and Interactions in Solution.** In: Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use. Advances in Polymer Science. Germany: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 280 p., 2005.

HARTREE, E. F. Determination of protein. A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, New York, v. 48, p. 422-427, ago.1972.

HAUG, A. Affinity of some bivalent metals for different types of alginates. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 15, n.8, 1794-1795, out. 1961.

HE, J.-A.; SAMUELSON, L.; LI, L.; KUMAR, J.; TRIPATHY, S.K. Oriented bacteriorhodopsin/polycation multilayers by electrostatic layer-by-layer assembly. **Langmuir**, Washington, v. 14, n. 7, p. 1674, mar. 1998.

HE, P.; HU, N. J. Interactions between heme proteins and dextran sulfate in layer-by-layer assembly films. **J. Phys. Chem. B.**, Washington, v. 108., n. 35, p.13144-13152, set. 2004.

HERALD, C. J. Guar gums. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocol.**, Oxford, v.3, p. 172-183, 1986.

HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.119, n. 38, 8916, set. 1997.

HOAGLAND, P.D.; FISHMAN, M.L.; KONJA, G.; CLAUSS, E. Size exclusion chromatography with viscosity detection of complex polysaccharides: component analysis. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 41, n. 8, p. 1274-1281, ago.1993.

HOOGENDAM, C.W.; KEIZER, A.; COHEN STUART, M.A.; BIJSTERBOSCH, B.H.; BATELAAN, J.G.; VAN DER HORST, P. M. Adsorption mechanisms of carboxymethyl cellulose on mineral surfaces. **Langmuir**, Washington, v. 14, n. 14, p. 3825-3839, jul. 1998.

HÜBSCH, E.; BALL, V.; SENGGER, B.; DECHER, G.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P. Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayers films: changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures. **Langmuir**, Washington, v. 20, n. 5, p. 1980-1985, mar. 2004.

HUMPHRIES, M.J. Cell adhesion assays. **Mol. Biotechnol.**, Totawa, v. 18, n.1, p.57-61, mai. 2001.

HUNG, S.L.; LEE, P.L.; CHEN, H.W.; CHEN, L.K.; KAO, C.L.; KING, C.C. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. **Virology**, New York, v. 257, n.1, p. 156-167, abr. 1999.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 31, p. 9-17, dez. 2002.

ITANO, K.; CHOI, J.; RUBNER, F. Mechanism of the pH-induced discontinuous swelling/deswelling transition of the poly(allylamine hydrochloride) – containing polyelectrolyte multilayer films. **Macromolecules**, Easton, v. 38, n. 8, p. 3450-3460, abr. 2005.

ISA - Institute for Storage Ring Facilities, Faculty of Sciences, Aarhus Universitet. Disponível em: <http://isa.au.dk/facilities/astrid/beamlines/cd1/cd1.asp>. Acesso em: 05/04/2011.

ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3 ed. London: Academic Press, 1994.

IZQUIERDO, A.; ONO, S.S.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P.; DECHER, G. Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. **Langmuir**, Washington, v. 21, n. 16, p.7558-7567, ago. 2005.

JABER, J.A.; CHASE, P.B.; SCHLENOFF, J.B. Actomyosin-driven motility on patterned polyelectrolyte mono-and multilayers. **Nano Letter.**, Washington, v. 3, n. 11, p. 1505-1509, nov. 2003.

JAIPURI, F. A.; COLLET, B.Y.M.; POHL, N. L. Synthesis and quantitative evaluation of *Glycero-D-manno*-heptose binding to concanavalin A by fluororous – tag assistance, **Angew. Chem.**, Weinheim, v.47, n.9, p. 1707-1710, 2008.

JEON, O.; POWELL, C.; AHMED, S.M.; ALSBERG, E. Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorable physical properties and cell adhesivity. **Tissue Eng. Part A**, New York, v. 16, n. 9, p. 2915-2925, ago. 2010.

JESSEL, N.; ATALAR, F.; LAVALLE, P.; MUTTERRER, J.; DECHER, G.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; OGIER, J. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayers architecture functionalized by embedded proteins. **Adv. Mater.**, Weinheim, v. 15, n. 9, p. 692-695, mai. 2003.

JÓ, T.A. **Desenvolvimento e aplicação de nanoestruturas a partir de xiloglucanas**. 176 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009a.

JÓ, T.A.; PETRI, D.F.S.; VALENGA, F.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M-R. Thin films of xyloglucans for BSA adsorption. **Mat. Sci. Eng. C.**, Lausanne, v. 29, n. 2, mar. 2009b.

JÓ, T.A.; PETRI, D.F.S.; BELTRAMINI, L. M.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M-R. Xyloglucan nano-aggregates: physico-chemical characterization in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 82, n. 2, p. 355-362, set. 2010.

KAKU, H.; GOLDSTEIN, I.J. Interactions of five D-mannose-specific lectins with a series of synthetic branched trisaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 213, p. 109-116, jun. 1991.

KALB, A.; LUSTIG, A. The molecular weight of concanavalin A. **Biochem Biophys Acta**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p.366-367, out. 1968.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J.K. Environmental effects of vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 99, n. 7, p. 2039-2044, mar. 1977.

KANAZAWA, K.; GORDON, J.G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid. **Anal. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 175, p. 99 – 105, 1985.

KARAMOLLAOĞLU, I.; ÖKTEM, H.A; MUTLU, M. QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v. 44, n. 2-3, p. 142-150, mai. 2008.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 113–131, mar. 2001.

KIELISZEWSKI, M. J., KAMYAB, A., LEYKAM, J. F., LAMPORT, D. T. A. A histidine-rich extension from *Zea mays* is an arabinogalactan protein. **Plant Physiol.**, Washington, v. 99, n. 2, p. 538-547, jun. 1992.

KITTREDGE, M.C.; DURST, T.S.; KITTREDGE, K. W. Heat-induced cross-linking of nylon-like weak polyelectrolyte multilayer films: UV–visible studies of methylene blue loading and rates of release. **Thin Solid Films**, Lausanne, v. 518, n. 14, p. 3949-3953, mai. 2010.

KOLASINSKA, M.; KRASTEVR.; GUTBERLET, T.; WARSZYNSKI, P. Layer-by-layer deposition of polyelectrolytes. Dipping versus spraying. **Langmuir**, Washington, v. 25, n. 2, p. 1224-1232, dez. 2009.

KOOP, H.S.; PRAES, C.E.O.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological behavior of gel of xanthan with seed galactomannan: Effect of hydroalcoholic-ascorbic. **Mat. Sci. Eng. C**. Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 559-563, mar. 2009.

KOSAKA, P.M. **Aplicações e caracterização de esteres de celulose**. 151 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KOTOV, N.A.; HARASZTI, T.; TURI, L.; ZAVALA, G.; GEER, R.E.; DEKANY, I.; FENDLER, J.H. Mechanism of and the defect formation in the self-assembly of polymeric polycation – montmorillonite ultrathin films. **J. Am. Chem. Soc.** Easton, v. 119, n. 29, p. 6821-6832, jul. 1997.

KOTOV, N.A. Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions. **Nanostruct. Mater.**, Tarrytown, v. 12, n. 5-8, p. 789-796, out. 1999.

KOVACEVIC, D.; BURGH, S. von der; KEIZER, A. de, COHEN STUART, M.A. Kinetics of formation and dissolution of weak polyelectrolyte multilayers: role of salt and free polyanions. **Langmuir**, Washington, v. 18, n. 14, p. 5607-5612, jul. 2002.

KROGMAN, K.C.; LYON, K.F.; HAMMOND, P. Metal ion reactive thin films using spray electrostatic lbl assembly. **J. Phys. Chem. B.**, Washington, v. 112, n. 46, p. 14453- 14460, ago. 2008.

KUMARA, M.T.; TRIPP, B.C.; MURALIDHARAN, S. Layer-by-layer assembly of bioengineered flagella protein nanotubes. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, n. 12, p. 3718-3722, nov. 2007.

KUNO, G.; VORNDAM, A.V.; GUBLER, D.J.; GÓMEZ, I. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. **J. Med. Virol.**, New York, v. 32, n. 2, p. 102–108, out. 1990.

LADAM, G.; SCHAAD, P.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P.; DECHER, G.; CUISINIER, F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. **Langmuir**, Washington, v. 16, n. 3, p. 1249-1255, fev. 2000.

LAL, R.; RAMACHANDRAN, S.; ARNSDORF, M.F. Multidimensional atomic force microscopy: a versatile novel technology for nanopharmacology research. **The AAPS Journal**, Virginia, v. 12, n. 4, dez. 2010.

LAMELAS, C.; AVALTRONI, F.; BENEDETTI, M.; WILKINSON, K. J.; SLAVEYKOVA, V. I. Quantifying Pb and Cd complexation by alginates and the role of metal binding on macromolecular aggregation. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, n. 5, p. 2756-2764, set-out. 2005.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 38, n.11, p. 2221-2295, nov. 1916.

LAVALLE, P.; PICART, C.; MUTTERER, J.; GERGELY, C.; REISS, H.; VOEGEL, J.-C.; SENGHER, B.; SCHAAF, P. Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth. **J. Phys. Chem. B**, Washington, v. 108, n. 2, p. 635-648, jan. 2004.

LÉONARD, D.; CHEVOLOT, Y.; HEGER, F.; MARTINS, J.; CROUT, D. H. G.; SIGRIST, H.; MATHIEU, H. J. ToF-SIMS and XPS study of photoactivatable reagents designed for surface glycoengineering. Part III. 5-Carboxamidopentyl-*N*-[*m*-[3-(trifluoromethyl) diazirin-3-yl] phenyl-β-D-galactopyranosyl] - (1->4) - 1-thio -β-D

glucopyranoside (lactose aryl diazirine) on diamond. **Surf. Interface Anal.** London, v. 31, n.6, p. 457-464, jun. 2001.

LEONARD, M.; RASTELLO DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; DALENÇON, F.; DELLACHERIE, E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 395-405, ago. 2004.

LI, Z.; GUNN, J.; CHEN, M.-H.; COOPER, A.; ZHANG, M. On-site alginate gelation for enhanced cell proliferation and uniform distribution in porous scaffolds. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, Hoboken, v. 86, n. 2, p. 552-559, ago. 2008.

LIEW, C. V., CHAN, L. W., CHING, L. A., HENG, P. W. S., Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 309, n.1-2, p. 25-37, fev. 2006.

LIMA, M.M.S.; ONO, L.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. Natural and sulphated polysaccharides from *Caesalpinaceae* seeds. **Latin Am. Appl. Res.**, Bahia Blanca, v. 26, p. 1-3, dez.1996.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res.**, San Diego, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINEZ-BATAILLON, P.; MONCHAU, F.; BIGERELLE, M.; HILDEBRAND, H.F. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. **Biomol. Eng.**, New York, v. 19, n. 2-6, p. 133-141, ago. 2002.

LIU, S.; KURTH, D.G.; VOLKMER, D. Polyoxometalates as pH-sensitive probes in self-assembled multilayers. **Chem. Commun.** Cambridge, n.9, p. 976-977, 2002.

LOVE, J.C.; ESTROFF, L.A.; KRIEBEL, J.K.; NUZZO, R.G.; WHITESIDES, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chem. Rev.**, Washington, v. 105, n. 4, p. 1103-1170, mar. 2005.

LU, C.; CZANDERNA, A. Applications of the piezoelectric quartz crystal microbalance: Methods and Phenomena. New York: Elsevier, 1984, v. 7.

LUBAMBO, A.F.; LUCYSZYN, N.; KLEIN, J.J.; SCHREINER, W.H.; CAMARGO, P.C. de; SIERAKOWSKI, M-R. Dewetting pattern and stability of thin xyloglucan films adsorbed on silicon and mica. **Colloids Surf. B**, Amstersdam, v. 70, n.2, p. 174-180, mai. 2009.

LUCAS E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

LUCYSZYN; N. **Aplicação de galactomananas como substitutas parciais do ágar no cultivo de tecidos vegetais**. 127 p. Tese (Doutorado em Processos

Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 358-364, fev. 2006.

LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; HOMMA, M.M.; SIERAKOWSKI, M-R. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biol. Plantarium**. Praha, v. 51, n. 1, p. 173-176, nov. 2007.

LUCYSZYN, N.; LUBAMBO, A.F.; MATOS, K.F.; MARVILLA, I.; SOUZA, C.F.de.; SIERAKOWSKI. Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds. **Mat. Sci. Eng. C**. Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 552-568, mar. 2009.

LUCYSZYN, N.; LUBAMBO, A.F.; ONO, L. JÓ, T.A., SOUZA, C.F.de.; M.-R. SIERAKOWSKI. Chemical, physico-chemical and cytotoxicity characterisation of xyloglucan from *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard seeds. **Food Hydrocol.**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1242-1250, mai. 2011.

LVOV, Y.; DECHER, G.; SUKHORUKOV, G. Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine). **Macromolecules**, Easton, v. 26, n. 20, p. 5396-5399, set. 1993.

LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T. Assembly of multicomponente protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 117, n. 22, 6117-6123, jun. 1995.

MACGREGOR, E. A.; GREENWOOD, C.T. Polymers in Nature. In: _____. **Polysaccharides**. Wiley: New York. 1980, p. 240–329.

MACIEL, J.S.; KOSAKA, P.M.; PAULA, R, C.M.; FEITOSA, J. P.A.; PETRI, D.F.S. Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 69, n. 3, p. 522-529, 2007.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C. MAQNUNSON, K.; WHISTLER, R.L. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In : WHISTLER, R. L. BEMILLER, J. N. **Industrial Gums Polysacchides and their Derivates**. 3 ed. New York: Academic Press. 1993, p. 215-218.

MANDEL, D.K.; KISHORE, N.; BREWER, C.F. Thermodynamic of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrate and ovoalbumin to concanavalin A. **Biochemistry**, Easton, v. 33, n. 5, p.1149-1156, fev. 1994.

MARTIN, B.R.; DERMODY, D.J.; REISS, B.D.; FANG, M.M.; LYON, L.A.; NATAN, M.J.; MALLOUK, T.E. Orthogonal self-assembly on colloidal gold-platinun nanorods.

Adv. Mater., Weinheim, v. 11, n. 12, p. 1021-1025, ago.1999.

MARTINS, G.V.; MERINO, E.G.; MANO, J.F.; ALVES, N.M. Crosslink effect and albumin adsorption onto chitosan/ alginate multilayers systems: an in situ QCM-D study. **Macromol. Biosci.**, Weinheim, v. 10, n. 12, p. 1444-1455, dez. 2010.

MARUYAMA, A.; ISHIHARA, T.; KIM, J.-S.; WAN KIM, S.; AKAIKE. Design of multi-functional nanoparticles as a DNA carrier. **Colloids Surf. A**, Amsterdam, v. 153, n. 1-3, p. 439-443, ago. 1999.

MAURSTAD, G.; MØRCH, Y.A.; BAUSCH, A.R.; STOKKE, B.T. Polyelectrolite layer interpenetration and swelling of alginate-chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 71, n. 4, p. 672-681, mar. 2008.

McCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WAILEL, R. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 92, p. 269-285, jun. 1981.

McCONAUGHY, S.D.; STROUD, P.A.; BOUDREAUX, B.; HESTER, R.D.; McCORNICK, C.L. Structural characterization and solution properties of a galacturonate polysaccharide derived from aloes vera capable of in situ gelation. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, n. 2, p.472-480, fev. 2008.

MERCÊ, A. L.R.; LOMBARDI, S.C.; MANGRICH,A.S.; REICHER, F.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M-R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cássia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu²⁺ using potentiometry and EPR spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 35, n. 1-2, p. 13-20, jan-fev.1998.

MĚZO, G.; REMÉNYI, J.; KAJTÁR, J.; BARNA, K.; GAÁL, D.; HUDECZ, F. Synthesis and conformational studies of poli(L-lisine) based branched polypeptides with Ser and Glu/Leu in the side chains. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 63, n.1-2, p. 81-95, jan. 2000.

MILES, A.J.; WALLACE, B.A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. **Chem. Soc. Rev.**, London, v. 35, n. 1, p. 39 - 51, jan. 2006.

MJAHED, H.; VOGEL, J.-C.; SENGHER, B.; CHASSEPOT, A.; RAMEAU, A.; BALL, V.; SCHAAF, P.; BOULMEDAIS, F. Hole formation induced by ionic strength increase exponentially growing multilayer films. **Soft. Matter**. London, v. 5, n.11, p. 2269-2276, 2009.

MOE, S.T.; SKJA K-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Swelling of covalently crosslinked alginate gels: Influence of ionic solutes and nonpolar solvents. **Macromolecules**, Easton, v. 26, n. 14, p. 3589-3597, jul.1993.

MÖLLER, C.; ALLEN, M.; ELINGS, V.; ENGEL, A.; MÜLLER, D.J. Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces. **Biophys. J.**, New York, v. 77, n. 2, p. 1150-1158, ago. 1999.

MONATH, T.P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington v. 91, n. 7, p. 2395-2400, mar. 1994.

MORAES, M.L.; GOMES, P.J.; RIBEIRO, P.A.; FREITAS, A. A.; KÖHLER, R.; OLIVEIRA JR., O.N.; RAPOSO, M. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes. **J. Colloid. Interface Sci.** New York, v. 350, n. 1, p. 268-274, out. 2010.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochem.**, New York, v. 47, n. 7 p. 1183-1189, abr. 1998.

MOREIRA, J.C.; DILVA, I.F.; WANG, S.H.; BALOGH, D.T. Determinação das constantes K e a da equação de Mark-Houwink de poli(p-acetóxiestireno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 80-82, jun. 2004.

MORRIS, E.R. Mixed polymer gels. In: Harris, P. **Food Gels**. London: Elsevier Applied Science. 1990, p. 291-359.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.65, n. 1-2, p.55-63, dez.1983.

MOTCHMANN, H.; STAMM, M.; TOPRAKCIOGLU, C. Adsorption kinetics of block copolymers from a good solvent: a two-stage process. **Macromolecules**, Washington, v. 24, n. 12, p. 3681-3688, jun. 1991.

MRKSICH, M.; WHITESIDES, M. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. **Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, Palo Alto, v. 25, p. 55-78. jun. 1996.

MRKSICH, M. A surface chemistry approach to studying cell adhesion. **Chem. Soc. Rev.**, London, v. 29, n. 4, p. 267-273, jun. 2000.

NAISMITH, J. H.; FIELD, R. A. Protein chemistry and structure. **J. Biol. Chem.**, Bethesda v. 271, n. 2, p. 972-976, jan. 1996.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; SCHWARTZ, O.; FIESCHI, F.; VIRELIZIER, J.-L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DESPRÉS, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Rep.**, Oxford, v. 4, n. 7, 723-728, jul. 2003.

NAVEA, S.; TAULER, R.; GOORMAGHTIGH, E.; JUAN, A. de. Chemometric tools for classification and elucidation of protein secondary structure from infrared and circular dichroism spectroscopic measurements. **Proteins: Structure, Function, Bioinformatics**, New York, v. 63, n. 2, p. 527-541, fev. 2006.

NGUYEN, S.; WINNIK, F.M.; BUSCHMANN, M.D. Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. **Carbohydr. Pol.**, Barking, v. 75, n. 3, p. 528-533, 2009.

NEISER, S.; DRAGET, K.I.; SMIDSDØRT, O. Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems. **Food Hydrocol.**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 445-458, nov.1999.

NEP, E.I.; CONWAY, B.R. Physicochemical characterization of grewia polysaccharide gum: effect of drying method. **Carbohydr. Pol.**, Barking, v. 84, n. 1, p. 446-453, fev. 2011.

NEUMANN, M. G.; SCHMITT, C. C.; IMAZAKI, E. T. A fluorescence study of the interaction between sodium alginate and surfactants. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, n. 10, p.1109–1117, mai. 2003.

NICKERSON, M. T., PAULSON, A. T., HALLET, F. R. Dilute solution properties of κ -carrageenan polysaccharides: effect of potassium and calcium ions on chain conformation. **Carbohydr. Pol.**, Barking, v. 58, n. 1, p. 25-33, out. 2004.

NIJDAM, J.J. ; LANGRISH, T.A.G. The effect of surface composition on the functional properties of milk powder. **J. Food Eng.** Essex, v. 77, n. 4, p. 919-925, 2006.

NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.; NOSEDA, M.D.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium (IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **J. Inorg. Biochem.**, New York, v. 103, n.5, p. 749-757, mai 2009.

NOMURA, T.; MINEMURA, A. Behavior of a piezoelectric quartz crystal in an aqueous-solution and the application to the determination of minute amount of cyanide. **Nippon Kagaku Kaishi**, Tokyo, p. 1621-1625, 1980.

OVERG, K.A.; UVERSKY, V.N. Secondary structure of the homologous proteins, a A-fetoprotein and serum albumin, from their circular dichroism and infrared spectra. **Prot. Pept. Lett.**, Hilversum, v.8, n.4, p. 297-302, ago. 2001.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.M.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M-R. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannas against yellow fever virus. (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, Amsterdam, v.60, n.3, p. 201-208, nov. 2003.

OSTROFF, R.M.; MAUL, D.; BOGART, G.R.; YANG, S.; CHRISTIAN, J.; HOPKINS, D.; CLARK, D.; TROTTER, B.; MODDEL, G. Fixed polarizer ellipsometry for simple and sensitive detection of thin films generated by specific molecular interactions: applications in immunoassays and DNA sequence detection. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 44, p. 2031-2035, set. 1998.

OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Pol. Gel and Networks**, Amsterdam, v. 6, n. 5, p. 393-408, out. 1988.

PAI, V.B.; KHAN, S.A. Gelation and rheology of xanthan/enzyme modified guar blends. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 49, n. 2, p. 207-216, ago. 2002.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 249, n.1-2, p. 139-147, dez. 2002.

PAULA de , S. O.; PIRES NETO, R. J.; CORRÊA, J. A. C. T.; ASSUMPÇÃO, S. R.; COSTA, M. L. S.; LIMA, D. M.; FONSECA, B. A. L. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. **Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.** v. 96, p. 266-269, 2002.

PAVOOR, P.V.; BELLARE, A.; STROM, A.; YANG, D.; COHEN, R.E. Mechanical characterization of polyelectrolyte multilayers using quasi-static nanoindentation. **Macromolecules**, Oxford, v. 37, n. 13, p. 4865–4871, jun. 2004.

PELHAM, R.J.; WANG, Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 94, n. 25, p.13661-13665, dez.1997.

PENMAN, A.; SANDERSON, G. R. A method for the determination of uronic sequence in alginates. **Carbohydr. Res.** Amsterdam, v. 25, n.2, p. 273–282, dez. 1972.

PEPPAS, N.A.; BURI, P.A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymers bioadhesion on soft tissues. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 2, p. 257-275, nov. 1985.

PEREIRA, E.M.A; SIERAKOWSKI, M.-R.; JÓ, T.A; MOREIRA, R.A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; FRANÇA, R.F.O.; FONSECA, B.A.L.; PETRI, D.F.S. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as support for immobilization of dengue virus particles. **Colloids Surf. B.**, Amsterdam, v. 66, n. p. 45-52, mai. 2008.

PEREIRA, E.M.A; DARIO, A.F.; FRANÇA, R.F.O.; FONSECA, B.A.L.; PETRI, D.F.S. Binding of dengue virus particles and dengue proteins onto solid surface. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, v.9, n. 2, p. 2602-2610, set. 2010.

PETKOWICZ, C.L.O.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M-R; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of *Caesalpinaceae*. **Phytochem.**, New York, v 49, n. 3, p. 737-743, out. 1998.

PETRI, D. F. S.; SCHIMMEL, T.; WENZ G.; SCHUNK, P. An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. **Langmuir**, Washington, v. 15, n. 13, p. 4520-4523, mai.1999.

PHYSICAL INORGANIC CHEMISTRY, TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN (2011). Disponível em: <http://www.ias.tuwien.ac.at/research/fghh/research/pic_research_sams.html>. Acesso em 01/04/2011.

PICART, C.; LADAM, G.; SENGER, B.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P.; CUISINIER, F.J.G.; GERGELY, C. Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: a comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. **J. Chem. Phys.**, New York, v. 115, n. 2, p. 1086-1094, jul. 2001a.

PICART, C.; LAVALLE, P; HUBERT, P.; CUISINIER, F.J.G.; DECHER, G.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid a solid surface. **Langmuir**, Washington, v. 17, n. 23, p. 7414-7424, nov. 2001b.

PICART, C.; MUTTERER, J.; RICHERT, L.; LUO, Y.; PRESTWICH, G.D.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; LAVALLE, P. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 99, n.20, p. 12531-12535, out. 2002.

PICART, C.; ELKAIM, R.; RICHERT, L.; AUDOIN, F.; CARDOSO, M.S.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; FRISCH, B. Primary cell adhesion on RGD-funcioanalizad and covalently crosslinked thin polyelectrolyte multilayers films. **Adv. Funct. Mater.**, Weinheim, v.15, n.1, p. 83-94, jan. 2005.

PIRES, L.; GORIN. P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. An active heparinoid obtained by sulphation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 46, n. 2, p. 165-169, out. 2001.

PONGJANYAKUL, T.; PUTTIPIPAKHACHORN, S. Alginate-magnesium aluminum silicate composite films: Effect of film thickness on physical characteristics and permeability. **Inter. J. Pharm.** Amsterdam, v. 356, n.1-2, p. 1-9, jan. 2008.

PORCEL, C.; LAVALLE, P.; BALL, V.; DECHER, G.; SENGER, B.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. **Langmuir**, Washington, v. 22, n. 9, p. 4376-4383, abr. 2006.

Q-SENSE. Disponível em: <<http://qsense.com/qcm-d-technology>>. Acesso em 05/04/2011.

QUIOCHO, F.A. Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features. **Pure Appl. Chem.**, Oxford, v. 61, n.7, p. 1293-1306, 1989.

RADEVA, T.; MILKOVA, V.; PETKANICHIN, I. Electro-optics of colloids coated with multilayers from strong polyelectrolytes: surface change relaxation. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 266, n.1, p. 141-147, out. 2003.

RAM, M.K.; YAVUZ, O.; LAHSANGAH, V.; ALDISSI, M. CO gas sensing from ultrathin nano-composite conducting polymer film. **Sens. Actuators B.**, Lausanne, v. 106, n. 2, p. 750-757, mai. 2005.

RAO, M.A. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods. In: RAO, M.A.; STEFFE, J.F. **Viscoelastic properties of foods.**, New York : Elsevier Applied Science, 1992. p. 207-231.

RAWLE, R.J.; SELASSIE, C.R.D., JOHAL, M.S. Creation of mammalian single- and double-stranded DNA surfaces: A real-time QCM-D study. **Langmuir**, Washington, v. 23, n.19, p. 9563–9566, set. 2007.

RAWLE, R.J.; JOHAL, M.S.; SELASSIE, C.R.D. A Real-Time QCM-D Approach to Monitoring Mammalian DNA Damage Using DNA Adsorbed to a Polyelectrolyte Surface. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, n. 1, p. 9-12, jan. 2008.

REEKE, J.R.G.N.; BECKER, J.W.; EDELMAN, G. M. The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. **J. Biol. Chem**, Bethesda, v. 250, n. 4, p. 1525-47, fev. 1975.

REES, D.A. Polysaccharide shapes and their interactions—some recent advances. **Pure Appl. Chem.**, Oxford, v. 53, n.1, p. 1–14, jul.1981.

REICHART, W.M.; BRUCKNER, C.J.; JOSEPH, J. Langmuir–Blodgett films and black lipid membranes in biospecific surface-selective sensors. **Thin Solid Films**. Lausanne, v. 152, n.1-2, p. 345-376, set.1987.

REID, G.J.S. Galactomannans. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. **Biochem. of Stor. Carbohydr.**, London: Academic Press. p. 265-286, 1985.

REN, K.; JI, J.; SHEN, J. Tunable DNA release from cross-linked ultrathin DNA/PLL multilayered films. **Bioconjug. Chem.**, Washington, v. 17, n. 1, p. 77-83, jan. 2006.

REY, F.A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 100, n. 12, p. 6899-6901, jun. 2003.

REVELL, D.J.; KNIGHT, J.R.; BLYTH, D.J.; HAINES, A.H.; RUSSEL, D.A. Self-assembled carbohydrate monolayers: formation and surface selective molecular recognition. **Langmuir**, Washington, v. 14, n. 16, p. 4517-4524, jul. 1998.

RICHERT, L.; BOUMEDAIS, F.; LAVALLE, P.; MUTTERER, J.; FERREUX, E.; DECHER, G.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; PICART, C. Improvement of stability

and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayers films by chemical cross-linking. **Biomacromolecules**, Washington, v. 5, n.2, p. 284-294, mar. 2004a

RICHERT, L.; ENGLER, A.J.; DISCHER, D.E.; PICART, C. Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. **Biomacromolecules**, Washington, v. 5, n. 5, p. 1908-1916, set. 2004b.

RICHERT, L.; LAVALLE, P.; PAYAN, E.; SHU, X.Z.; PRESTWICH, G.D.; STOLTZ, J.-F.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; PICART, C. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. **Langmuir**, Washington, v. 20, n. 2, p. 448-458, jan. 2004c.

RIGOBERTO, A.; PARK, M.; BABA, A.; KANEKO, F. Photoalignment in ultrathin films of a layer-by-layer deposited water-soluble azobenzene dye. **Langmuir**, Washington, v.19, n.3, p. 654-665, fev. 2003.

RINI, J.M.; HARDMAN, K.D.; EINSPAHR, H.; SUDDATH, F.L.; CARVER, J.P. X-ray crystal structure of pea lectin-trimannoside complex at 2.6 Å resolution. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, n. 14, p. 10126-10132, mai. 1993.

ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S.; MORRIS, E. R. Viscosity-Molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 17-32, set.1982.

ROGER, P.; AXELOS, M.A.V.; COLONNA, P. SEC-MALLS and SANS studies applied to solution behavior of linear α -glucans. **Macromolecules**, Easton, v. 33, n.7, p. 2446-2455, abr. 2000.

ROSS-MURPHY, S.B. Small deformation measurements. In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHELL, J. R. (Ed.). **Foods structured - Its creation and evaluation**. London: Butter-worths, 1988. p. 387-400.

RUSLING, J.F. Sensors for toxicity of chemical and oxidative stress based on eletrochemical catalytic DNA oxidation. **Biosens. Bioelettron.**, Essex, v. 20., n. 5, p. 1022-1028, nov. 2004.

SAAD, M.; GAIANI, C.; MULLET, M.; SCHER, J.; CUQ, B. X-ray photoelectron spectroscopy for wheat powders: measurement of surface chemicalcomposition. **J. Agric. Food Chem.** Easton, v. 59, n.5, p. 1527-1540, fev. 2011.

SAEMAN, J.F.; MOORE, W.E.; MITCHELL, R.L.; MILLETT, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromathography. **TAPPI**. v. 37, n. 8, p. 336-343, 1954.

SAIFUDDIN, M.; HART, M.L.; GEWURZ, H.; ZHANG, Y.; SPEAR, G.T. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. **J. Gen. Virol.**, London, v. 81, n. 4, p. 949-955, abr. 2000.

SAKAI, S.; HASHIMOTO, I.; KAWAKAMI, K. Development of alginate-agarose subsieve-size capsules for subsequent modification with a polyelectrolyte complex membrane. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v. 30, n.1, p. 76-81, mai. 2006.

SALOMÄKI, M.; VINOKUROV, I.A.; KANKARE, J. Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. **Langmuir**, Washington, v. 21, n. 24, p. 11232-11240, nov. 2005.

SANDERS, D. A. R.; MOOTHOO, D. N.; RAFTERY, J.; HOWARD, A. J.; HELLIWELL, J. R.; NAISMITH, J. H. The 1.2 Å resolution structure of the con-A dimannose complex. **J. Mol. Biol.**, London, v. 310, n. 4, p. 875-884, jul. 2001.

SAPIR, Y.; KRYUKOV, O.; COHEN, S. Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration. **Biomaterials**, Surrey, v. 32, n. 7, p. 1838-1847, mar. 2011.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pré-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 66, n. 1, p. 1-7, out. 2006.

SATO, K.; KODAMA, D.; ANZAI, J.-I. Sugar-sensitive thin films composed of composed of concanavalin A and sugar-bearing polymers. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 21, n.11, nov. 2005.

SAUERBREY, G. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. **Z. Phys.**, Berlin, v. 155, n. 2, p. 206-222, fev. 1959.

SAWADEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 37, n. 12, p. 1602-1604, nov. 1965.

SCHILLING, C. H.; LI, C.; TOMASIK, P.; KIM, J.-C. The rheology of alumina suspensions: influence of polysaccharides. **Eur. Ceram. Soc.**, Oxford, v. 22, p. 923-931, jun. 2002

SCHLENOFF, J.B.; DUBAS, S.T.; FARHAT, T. Sprayed polyelectrolyte multilayers. **Langmuir**, Washington, v. 16, n. 26, p. 9968- 9969, nov. 2000.

SCHNEIDER, G.; NERAMBOURG, N.; PRAHO, R.; WERTZ, H.V.; BLANCHARD-DESCE, M.; DECHER, G. Distance-dependent fluorescence quenching on gold nanoparticles ensheathed with layer-by-layer assembled polyelectrolytes. **Nano Lett.**, Washington, v. 6, n. 3, p. 530-536, jan. 2006.

SCHNEIDER, A.; BOLCATO-BELLEMIN, A.L.; FRANCIUS, G.; JEDRZEJWSKA, J.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; FRISCH, B.; PICART, C. Glycated polyelectrolyte multilayer films: differential adhesion of primary versus tumor cells. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 10, p. 2882-2889, out. 2006.

SCHNEIDER, A.; PICART, C.; SENGHER, B.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; FRISCH,

B. Layer-by-layer films from hyaluronan and amine-modified hyaluronan. **Langmuir**, Washington, v. 23, n.5, p. 2655-2662, set. 2007.

SCHOELER, B.; DELORME, N.; DOENCH, I.; SUKHORUKOV, G. B.; FERY, A.; GLINEL, K. Polyelectrolyte films based on polysaccharides of different conformations: effect on multilayer structure and mechanical properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 6, p. 2065-2071, jun. 2006.

SCHUBERT, D.W. Spin coating as a method for polymer molecular weight determination. **Polym. Bull.**, Berlin, v. 38, n. 2, p. 177-184, fev. 1997.

SCHUBERT, D.W.; DUNKEL, T. Spin coating from a molecular point of view: its concentration regimes, influence of molar mass distribution. **Mat. Res. Innov.**, Berlin, v. 7, p. 314-321, out. 2003.

SCHWARZ, F.P.; PURI, K.D.; BHAT, R.G.; SUROLIA, A. Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Psium sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, n. 11, p. 7668-7667, abr. 1993.

SCHWINTÉ, P.; BALL, V.; SZALONTAL, B.; HAIKEL, Y.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P. Secondary structure of proteins adsorbed onto embedded in polyelectrolyte multilayers. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 6, p. 1135-1143, nov. 2002.

SEAH, M.P.; DENCH, W.A. Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standart data base for electron inelastic mean free paths in solids. **Surf. Interface Anal.**, London, v. 1, n. 1, p. 2-11, fev. 1979.

SENARATNE, W.; ANDRUZZI, L.; OBER, C.K. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, n. 5, p. 2427- 2448, ago. 2005.

SEYREK, E.; DUBIN, P.L.; TRIBET, C.; GAMBLE, E.A. Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 2, p. 273-282, mar. 2003.

SHAW, D.J. Introduction to colloid and surface chemistry, 4 Ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1992.

SHILPA, A.; AGRAWAL, S.S.; RAY, A.R. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. **Polym. Rev.**, New York, v. 43, n. 2, p. 187-221, jan. 2003.

SHIMAZAKI, Y.; MITSUISHI, M.; ITO, S.; YAMAMOTO, M. Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charged-transfer interaction. **Langmuir**, Washington, v. 13, n. 6, p. 1385-1387, mar. 1997.

SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A.G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, Surrey, v. 24, n. 24, p. 4353-4364, nov. 2003.

SHOBHA, M.S.; VISHU KUMAR, A.B; THARANATHAN, R.N.; KOKA, R.; GAONKAR, A.K., Modification of guar galactomannan the aid of *Aspergillus niger* pectinase. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 62, n. 3, p.267-273, dez. 2005.

SIERAKOWSKI, M.-R.; MILAS, M.; DESBRIÉRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 42, n. 1, p. 51-57, mai. 2000.

SIERAKOWSKI, M.-R.; FREITAS, R.A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D.F.S. Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 49, n. 2, p. 167-175, ago. 2002.

SIERAKOWSKI, M.-R.; CASTRO, L.B.R.; LUCYSZYN, N.; PETRI, D.F.S. Assembling of xyloglucans and lectin onto Si wafers and onto amino-terminated surfaces. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 1017- 1022, 2007.

SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 148-159, out. 2006.

SILVA, H.S.; UEHARA, T.M.; BERGAMASKI, K.; MIRANDA, P. B. Molecular ordering in layer-by-layer polyelectrolytes films studied by sum-frequency vibrational spectroscopy: the effects of drying procedures. **J. Nanosci. Nanotechnol.** Stevenson Ranch, v. 8, n. 7, p. 3399-3405, jul. 2008.

SILVA, H.S.; MIRANDA, P.B. Molecular ordering of layer-by-layer polyelectrolyte films studied by sum-frequency vibrational spectroscopy. **J. Phys. Chem. B.**, Washington, v. 113, n. 30, p. 10068-10071, jul. 2009.

SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 11, p. 209-220, 1987.

SIQUEIRA, D.F.; BREINER, U.; STADLER, R.; STAMM, M. Adsorption behavior of functionalized polystyrene-block-polybutadiene with randomly attached adsorbing sites. **Langmuir**, Washington, v. 11, n. 5, p. 1680-1687, mai. 1995.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydr. Polym.**, Barking. v. 59, n. 3, p. 339-350, fev. 2005.

SMIDSRØD, O. Solution properties of alginate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 359-372, jun.1970.

SMIDSRØD, O.; SKJAAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, p.71-78, 1990.

SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMAKI, T. HAKONEM, T.; TAHVONEN, R. Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v. 122, n. 6, p. 878-883, nov. 1997.

SOUZA, C.F. de. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea***. 114 p. Dissertação. (Mestrado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SOUZA, C.F. de.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F.A.; SIERAKOWSKI, M.-R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 82, n. 3, p. 641-647, out. 2010.

SOUZA, C.F. de.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F.A.; SIERAKOWSKI, M.-R. Oxidation and N-alkylation at the C-6 position of galactomannan extracted from *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds. **Macromol. Symp.**, Heidelberg, v. 299-300, p. 66-73, jan. 2011.

SRIVASTAVA, R.; McSHANE, M.J. Application of self-assembled ultra-thin film coating to stabilize macromolecule encapsulation alginate microspheres. **J. Microencapsulation**, London, v. 22, n. 4, p. 397-411, jun. 2005.

SRIVASTAVA, A.; WAITE, J.H.; STUCKY, G.D.; MIKHAILOVSKY, A. Fluorescence investigations into complex coacervation between polyvinylimidazole and sodium alginate. **Macromolecules**, Easton, v. 42, n.6, p. 2168-2176, mar. 2009.

STEVENS, E.S. Carbohydrates. In : FASMAN, G.D (Ed). **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. 1.ed. New York: Plenum Press, 1996, p. 501-530.

STOCKTON, W.B.; RUBNER, M.F. Molecular layer processing of polyaniline via the use of hydrogen bonding interactions. **MRS Proceedings**, Cambridge, v. 369, p. 587-592, 1995.

STOCKWELL, A. F.; WALKER, S.E. In vitro evaluation of alginate gel systems as sustained release drug delivery systems. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 3, n. 1-4, p. 167-175, jul. 1986.

SUZUKI, Y.; PICHON, B.P.; D'ELIA, D.; BEAUGER, C.; YOSHIKAWA, S. Preparation and microstructured of titanate nanowire thin films by spray layer-by-layer assembly method. **J. Ceram. Soc. Jpn.** Japan, v. 117, n. 1363, p. 381-384, mar. 2009.

SYNYTSYA, A.; SYNYTSYA, A.; BLAFKOVA, P.; VOLKA, K.; KRÁL, V. Interaction of meso-tetrakis(4-ulphonatophenyl)porphine with chitosan in aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 225-235, fev. 2007.

TALHAM, D.R. Conducting and magnetic Langmuir-Blodgett films. **Chem. Rev.**, Washington, v. 104, n. 11, p. 5479-5502, nov. 2004.

TANG, Z.; WANG, Y.; PODSIALLO, P.; KOTOV, N.A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Adv. Mater.**, Weinheim, v. 18, n. 24, p. 3203-3224, nov. 2006.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M.A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D.L.; STEINMAN, R.M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M.A. DC-SIGN (CD209) Mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, New York, v. 197, n. 7, p. 823-829, abr. 2003.

THIERRY, B.; WINNIK, F.M.; MERHI, Y.; SILVER, J.; TABRIZIAN, M. Bioactive coating of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 6, p. 1564-1571, nov. 2003.

THUNDAT, T.; ALLISON, D.P.; WARMACK, R.J. Stretched DNA structures observed with atomic forcemicroscopy. **Nucl. Acids Res.**, Oxford, v. 22, n. 20, p. 4224-4228, out. 1994.

TIAN, L.; YAM, L.; ZHOU, N.; TAT, H.; UHRICH, K. E. Amphiphilic scorpion-like macromolecules: Design, synthesis, and characterization. **Macromolecules**, Easton, v. 37, n. 2, p. 538-543, jan. 2004.

TORRES, M.R.; SOUZA, A.P.A.; SILVA FILHO, E.A.T.; MELO, D.F.; FEITOSA, J.P.A.; PAULA, R.C.M. de; LIMA, M.G.S. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 342, n. 14, p. 2067-2074, jun. 2007.

TROPICAL FORAGES. Disponível em: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Leucaena_leucocephala.htm. Acesso em 05/04/2011.

ULMAN, A. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir – Blodgett to self-assembly. Boston: Academic Press; 1991.

USHIKI, T.; HITOMI, J.; OGURA, S.; UMEMOTO, T.; SHIGENO, M. Atomic force microscopy in histology and cytology. **Arch. Histol. Cytol.**, Nigata, v. 59, n. 5, p. 421-431, dez. 1996.

VALENGA, F. **Estudos de interação entre galactomanana e alginate e possíveis aplicações**. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

VALENGA, F.; LUCYSZYN, N.; SOUZA, C.F. de.; LUBAMBO, A.F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Galactomannan-alginate synergism applied in albumin encapsulation. **Macromol. Symp.**, Heidelberg, v. 299-300, p. 99-106, jan. 2011.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R.M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 664-679, out. 2000.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTINÉZ, C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. **Food Hydrocol.**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 536-547, mar. 2009.

VARGAS-RECHIA, C.G.; SIERAKOWSKI, M-R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Polysaccharides from seeds of *Senna multijugal*. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford. v. 17, n. 6, p. 409-413, dez. 1995.

VAUGHN, D.W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T.P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 181, n. 1, p. 2-9, jan. 2000.

VAUTIER, D.; HEMMERLÉ, J.; VODOUHE, C.; KOENIG, G.; RICHERT, L.; PICART, C.; VOEGEL, J.-C.; DEBRY, C.; CHLUBA, J.; OGIER, J. 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells. **Cell Motil. Cytoskelet.**, New York, v. 56, n. 3, p. 147-158, nov. 2003.

VEDHA, H.B.N.; BRAHMA, R.A.; SAMYUKTHA, R.B. Floating Drug Delivery of Nevirapine as a Gastroretentive System. **J. Young Pharm.**, Mumbai, v. 2, n. 4, p. 350-355, out-dez. 2010.

VENDRUSCOLO, C.W.; FERRERO, C.; PINEDA, E.A.G.; SILVEIRA, J.L.M.; FREITAS, R.A.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, R.; BRESOLIN, T.M.B. Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scrabella*: Effect of drying method. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 76, n. 1, p. 86-93, mar. 2009a.

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 296, n. 1-2, p. 1-11, mai. 2009b.

VENYAMINOV, S. Y.; YANG, J. T. Determination of Protein Structure in Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, In: FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. 1. ed., Nova Iorque: Plenum Press, p. 70-107, 1996.

VERICAT, C.; VELA, M.E.; SALVAREZZA, R.C. Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. **PCCP**, Cambridge, v. 7, n. 18, p. 3258-3268, ago. 2005.

VERWEY, E.J.W.; OVERBEEK, J.Th.G. **Theory of the stability of lyophobic colloids**. New York: Elsevier, 1948.

VIEBKE, C.; PICULELL, L. Adsorption of galactomannans onto agarose. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 29, n. 1, p. 1-5, jan. 1992.

VIEIRA, N.A.B.; MOSCARDINI, M.S.; TIERA, V.A.O.; TIERA, M.J. Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: a fluorescence probe study. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 53, p. 137-143, ago. 2003.

VOINOVA, M.V.; RODHAL, M.; JONSON, M.; KASEMO, B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: continuum mechanism approach. **Physical Scripta**, Stockholm, v. 59, n. 5, p. 391-96, 1999.

VOZAR, S.; POH, Y.-C.; SERBOWICZ, T.; BACHNER, M.; PODSIADLO, P.; VERPLOEGEN, E.; KOTOV, N.; HART, J. Automated spin-assisted layer-by-layer assembly of nanocomposites. **Rev. Sci. Instrum.**, Rochester, v. 80, n. 2, fev. 2009.

WALSH, C.B.; FRANCES, E.I. Ultrathin PMMA films spin-coated from toluene solution. **Thin Solid Films**, Lausanne, v. 429, n. 1-2, p. 71-76, abr. 2003.

WALTER, R.H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. San Diego : Academic Press, 1998.

WANG, F.; PETERS, S.; GUZDA, J.; BLUNK, R.H.; ANGELPOULOS, A.P. Silica nanoparticle layer-by-layer assembly on gold. **Langmuir**, Washington, v. 25, n. 8, p. 4384-4392, mar. 2009.

WANG, Y.; ANGELATOS, A.S.; CARUSO, F. Template synthesis of nanostructured materials via layer-by-layer assembly. **Chem. Mat.**, Washington, v. 20, n. 3, p. 848-858, jan. 2008.

WATANABE, A.M. **Admitância / Impedância eletroacústica aplicada ao estudo da formação de monocamadas automontadas e da afinidade proteínas / carboidratos**. 99 f. Dissertação – Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

WEDLOCK, D.J.; FASIHUDDIN, B.A.; PHILLIPS, G.O. Comparison of molecular weight determination of sodium alginate by sedimentation-diffusion and light scattering. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 8, n.1, p. 57-61, fev. 1986.

WHISTLER, R. L. Solubility of Polysaccharides and their behaviour in solution. In: **Carbohydr. Solution**. ACS Advances in Chemistry Series, 117, 1973. p. 242.

WIKSTRÖM, A.; SVEDHEM, S.; SIVIGNON, M.; KASEMO, B. Real-time QCM-D monitoring of electrostatically driven lipid transfer between two lipid bilayer membranes. **J. Phys. Chem. B.**, Washington, v. 112, n. 44, p. 14069-14074, out. 2008.

WINNIK, F. M. Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. **Chem. Rev.**, Washington, v. 93, n. 2, p. 587–614, mar. 1993.

WINTER, H.H.; CHAMBON, F. Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. **J. Rheol.**, New York, v. 30, n. 2, p. 367- 382, 1986.

WITTMER, C.R.; PHELPS, J.A.; SALTZMAN, W.M.; VAN TASSEL, P.R. Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption and cell attachment studies. **Biomaterials**, Surrey, v. 28, n. 5, p. 851-860, fev 2007.

WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINIT, S. Zeta potential (ζ) and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. **Stärke**, Weinheim, v. 57, n. 1, p. 32-37, jan. 2005.

WORANOVICZ, S.M.; GORIN, P.A.; MARCELLI, M.P.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of lichens of the *Genus cladonia*. **Lichenologist**, London, v. 29, n.5, p.471-481, mar. 1997.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, Dengue and dengue haemorrhagic fever. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>, 2011. Acesso em 06/04/2011.

WU, J.; DENG, X.; ZHANG, Y.; WANG, L.; TIAN, B.Q.; XIE, B.-J. Application of Atomic Force Microscopy in the Study of Polysaccharide. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 8, n. 12, p. 1458-1465, dez. 2009.

XU, J.B.; BARTLEY, J.P.; JOHNSON, R.A. Preparation and characterization of alginate – carragenan hydrogel films crosslinked using a water- soluble carboiimide (WSC). **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v. 218, n.1-2, p. 131-146, jul. 2003.

YALPANI, M. **Polysaccharides : synthesis, modifications and structure / properties relations**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 1-7.

YAMPOLSKAYA, G.; PLATIKANOV, D. Proteins at fluid interfaces: Adsorption layers and thin liquid films. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amstredam, v. 128-130, p. 159-183, dez. 2006.

YANG, J.; TAKEYASU, K.; SHAO, Z. Atomic forcemicroscopy of DNA molecules. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 301, n. 2, p. 173-176, abr. 1992.

YANG, S.; MENDELSON, J.D.; RUBNER, M.F. New class of ultrathin, highly cell-adhesion-resistant polyelectrolyte multilayers with micropatterning capabilities. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 4, p. 987–994, mai. 2003.

YANG, Z.; SI, S.; ZHANG, C.; SONG, G. Quartz crystal microbalance studies on bilirubin adsorption on selfassembled phospholipid bilayers. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 305, n. 1, p. 1–6, jan. 2007a.

YANG, L.; ZHANG, B.; WEN, L.; LIANG, Q.; ZHANG, L.-M. Amphiphilic cholesterol grafted sodium alginate derivative: synthesis and self-assembly in aqueous solution. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 68, n. 2, p. 218-225, mar. 2007b.

YANG, S.H.; PARK, J.H.; CHOI, I.S. Layer-by-layer approach to bio-inspired, large-area formation of silica thin films. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Korea, 2009, v. 30, n. 9, p. 2165 - 2190, set. 2009.

ZASADZINSKI, J.A.; VISWANATHAN, R.; MADSEN, L.; GARNAES, J.; SCHWARTZ, D.K. Langmuir-Blodgett films. **Science**, Washington, v. 263, p. 1726-1733, mar. 1994.

ZHAI, L.; CEBECI, F.C.; COHEN, R.E.; RUBNER, M.F. Stable superhydrophobic coatings from polyelectrolyte multilayers. **Nano Letter.**, Washington, v. 4, n.7, p. 1349-1353, jul. 2004.

ZHAN, D. F.; RIDOUT, M.J.; BROWNSEY, G.J.; MORRIS, V.J. Xanthan – locust bean gum interactions and gelation. **Carbohydr. Pol.**, Barking, v. 21, n.1, p. 53-58. 1993.

ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 66, n. 7, p. 712-719, jul. 2006.

ZHANG, J.; SENGER, B.; VAUTIER, D.; PICART, C.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J-C.; LAVALLE, P. Natural polyelectrolyte films based on layer-by-layer deposition of collagen and hyaluronic acid. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, n.16, p. 3353-3361, jun. 2005.

ZHANG, D.; VANGALA, K.; JIANG, D.; ZOU, S.; PECHAN, T. Drop coating deposition Raman spectroscopy by fluorescein isothiocyanate labeled protein. **Appl. Spectrosc.**, Baltimore, v. 64, n. 10, p. 1078-1085, out. 2010.